INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária de Beja

Curso de Mestrado em Engenharia Alimentar

CARACTERIZAÇÃO FENÓLICA DE AZEITES VIRGENS PROVENIENTES DA CULTIVAR GALEGA VULGAR E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR HPLC

Daniela Cristina Parrinha Freitas

BEJA

2013

INSTITUTO POLITECNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária de Beja

Curso de Mestrado em Engenharia Alimentar

CARACTERIZAÇÃO FENÓLICA DE AZEITES VIRGENS PROVENIENTES DA CULTIVAR GALEGA VULGAR E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR HPLC

Relatório de projeto de dissertação de mestrado apresentado na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja

Elaborado por:

Daniela Cristina Parrinha Freitas

Orientado por:

Engª. Isabel Maria Pereira Caldas Baer

BEJA

2013

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Professora Engª Isabel Baer, pela disponibilidade manifestada para acompanhar este trabalho, pela orientação científica, pelos proveitosos comentários e esclarecimentos, pela acessibilidade e simpatia sempre presentes;

Ao Professor Doutor Nuno Bartolomeu Alvarenga, pela sua pronta disponibilidade e pelos esclarecimentos e ajuda que me deu para o tratamento estatístico dos dados;

À Professora Doutora Silvina Ferro Palma, pelas proveitosas sugestões que me transmitiu e pela sua disponibilidade;

A todos os docentes do Mestrado em Engenharia Alimentar, da Escola Superior Agrária de Beja, o meu muito obrigado pelos ensinamentos que me transmitiram;

Aos meus colegas e amigos de laboratório, pelo apoio e incentivo transmitidos ao longo do trabalho;

Às empresas que me doaram as amostras para poder realizar este projeto;

Ao CEBAL, na pessoa da Dra. Conceição Fernandes pela cedência do equipamento HPLC e pelos esclarecimentos prestados;

Aos meus pais, pois é com grande alegria e gratidão que lhes dedico esta minha vitória, uma vez que me possibilitaram todo o suporte seja ele emocional ou financeiro, no decorrer da minha vida;

E ao André Jesus, pelo incentivo e apoio ao longo de todo este trabalho.

RESUMO

A composição final do azeite virgem resulta de um elevado número de fatores que evoluem desde a formação do azeite na azeitona até ao momento do seu consumo. O principal objetivo deste projeto foi a caracterização fenólica de azeites virgens obtidos da variedade Galega vulgar em dois estados de maturação, provenientes de olivais e lagares das margens esquerda e direita do rio Guadiana. Todas as amostras foram extraídas pelo método centrífugo de duas fases e recolhidas á saída da centrífuga vertical no início de Novembro e de Dezembro.

Simultaneamente validou-se um método de identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC.

Após a realização das análises químicas classificaram-se todas as amostras como azeite virgem extra e confirmou-se a existência de diferenças na sua composição. O teor de polifenóis totais foi superior nas amostras obtidas na margem esquerda do Rio Guadiana e no estado de maturação verde.

Após a determinação fenólica por HPLC quantificaram-se os teores de hidroxitirosol, oleuropeína, ácido gálico e cafeico e confirmou-se uma maior concentração destes compostos nas amostras de maturação verde oriundas da margem esquerda do rio Guadiana, especialmente oleuropeína.

Palavras-chave: Azeite virgem, azeitona, Galega vulgar, maturação, polifenóis, HPLC, Rio Guadiana.

ABSTRACT

The final composition of a virgin olive oil results in a large number of factors that evolve from the formation of the olive oil on the fruit until the moment of its consum. The main objective of this project was to characterize the phenolic composition of virgin olive oils obtained from the variety Galega vulgar in two stages of maturation, obtained from olive groves and mills situated on the left and right banks of the river Guadiana. Simultaneously we validated a method of identification and quantitation of phenolic compounds by HPLC.

All samples were extracted using the two-phase centrifugal method and were collected at the output of the vertical centrifuge at the beginning of November and December.

After the chemical analyzes all olive oils were classified as extra virgin and we confirmed differences in its composition. The total polyphenol content was higher in the samples obtained on the left bank of the river Guadiana and on the green ripeness degree.

After the determination and quantification of the phenolic compounds: hydroxytyrosol, oleuropein, gallic acid and caffeic acid by HPLC it was possible to ratify a higher concentration of these compounds in olive oils on the green ripeness degree arising from the left bank of the river Guadiana, specially oleuropein.

Keywords: Virgin olive oil, olive fruit, Galega vulgar, maturation, polyphenols, HPLC, River Guadiana.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

kg - quilograma

mg - miligrama

g - grama

µg - micrograma

L - Litro

ml - mililitro

º C - graus Celsius

m - metro

cm - centímetro

mm - milímetros

m^3 - metros cúbicos

meq - miliequivalentes

nm - nanómetros

µl - microlitros

Pa - Pascal

s - segundo

min - minuto

ppm - partes por milhão

rpm - rotações por minuto

DOP - Denominação de Origem Portuguesa

HPLC - High Pressure Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

CAPITULO I - INTRODUÇÃO

O azeite virgem é muito apreciado desde a antiguidade pelo seu valor gastronómico, pelas suas características químicas, biológicas e organoléticas, mas também porque as suas propriedades preventivas e terapêuticas fazem dele uma gordura absolutamente insubstituível. O Azeite é uma gordura essencialmente monoinsaturada, rica em ácido oleico, vitamina E e outros antioxidantes naturais (carotenos, polifenóis e tocoferóis) que ajudam o nosso organismo a defender-se dos "radicais livres" responsáveis pelo envelhecimento celular, prevenindo os efeitos nocivos da idade sobre as funções cerebrais e o envelhecimento dos tecidos e órgãos em geral. Pelo seu alto teor em ácidos gordos monoinsaturados, é também aconselhado na prevenção da diabetes, influenciando positivamente os valores de açúcar e gordura no sangue, e a nível ósseo favorece a mineralização, estimulando o crescimento e favorecendo a absorção do cálcio (Casa do Azeite, 2013).

A produção de azeite tem vindo a aumentar nos últimos anos, especialmente no Alentejo, de todo o azeite extraído em Portugal nas campanhas 2010/11 e 2011/12 mais de 50% corresponde ao Alentejo. A cultivar que predomina em praticamente todas as regiões é a Galega vulgar, especialmente no Alentejo onde esta cultivar tem uma representatividade de 51% face às outras (MADRP/GPP, 2011 ; MAMAOT/GPP, 2012).

O azeite virgem é constituído por vários compostos, entre os quais estão os compostos fenólicos, conhecidos por terem muitas características benéficas: têm atividade biológica e microbiológica, previnem os danos oxidativos e as inflamações nos tecidos e células (Perez-Trujillo *et al.*, 2010).

O teor de polifenóis do azeite virgem é influenciado pelo sistema de cultura, pelos fatores agronómicos (como clima, solo, irrigação), pela cultivar, pelo grau de maturação dos frutos, pelas condições de armazenamento da azeitona e pelo processo de extração usado (Matos *et al.*, 2001). Pois as condições operatórias aplicadas durante o esmagamento, batimento e separação, são os aspetos que mais influenciam o processo de extração mecânica causando uma grande variação de concentração de polifenóis do azeite virgem (Servili *et al.*, 2009). Polifenóis, como a oleuropeína, tirosol,

hidroxitirosol e oleocantal, encontrados no azeite, são antioxidantes extremamente fortes. A sua atividade antioxidante é comparável com a dos antioxidantes artificiais, como o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT), que são conhecidos pelas funções benéficas que desempenham na nossa saúde (Hatzakis, 2012).
Os polifenóis presentes no azeite podem-se analisar quantitativamente, por exemplo pela análise química aos polifenóis totais, mas também quantitativa e qualitativamente por HPLC, obtendo a indicação de quais os polifenóis presentes e qual a sua concentração.

A técnica HPLC que é a designação mais comum de "High Pressure Liquid Chromatography", ou seja, Cromatografia Líquida de Alta Pressão não é recente, as suas condições essenciais foram estabelecidas por Martin e Synge em 1941, mas só recentemente a sua realização experimental se foi estabelecendo e difundindo (Vital, 2002).
Nesta técnica de separação os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases, uma estacionária e outra móvel que se desloca numa determinada direção (Vital, 2002).
A técnica HPLC utiliza uma fase móvel líquida, ou eluente, para separar os componentes de uma mistura, os quais, são inicialmente dissolvidos num solvente e posteriormente forçados a passar por uma coluna cromatográfica a elevada pressão, onde ocorre a separação propriamente dita dos componentes. A fase estacionária é definida como um material imóvel que existe na coluna (Vital, 2002). As substâncias presentes na amostra, devido às suas diferenças estruturais moleculares e grupos funcionais, dispõem de distintos graus de afinidade com as fases móvel e estacionária pelo que as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica, que é visualizada num cromatograma pelo aparecimento de diversos picos. A identificação das substâncias pretendidas é, em geral, conseguida através do tempo de retenção (Vital, 2002).

Como cada vez mais os consumidores estão empenhados em consumir melhores produtos e em conhecer mais aprofundadamente os produtos que consomem, o interesse deste trabalho relaciona-se com isso mesmo, caracterizando através de análises químicas todas as amostras de azeite virgem recolhidas e também efetuando a sua caracterização fenólica por HPLC.

Desta forma pode-se dizer que os principais objetivos deste projeto foram a análise da evolução fenólica no decorrer da maturação, a validação do método a usar para a determinação dos compostos fenólicos por HPLC em azeite virgem extraído de azeitonas da cultivar Galega vulgar e também a verificação da existência de diferenças nos teores de polifenóis totais das amostras da margem esquerda do Rio Guadiana para a margem direita, uma vez que como referi anteriormente as características edafoclimáticas podem influenciar os polifenóis presentes no azeite.

CAPITULO II – CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

2.1) Oliveira

2.1.1) História

A oliveira que todos conhecem, "mãe" das azeitonas que produzem o azeite que consumimos, é da espécie *Olea europaea L*. (Casa do Azeite, 2013).

A oliveira, valorizado pela sua beleza e pelo seu fruto, e faz parte da civilização mediterrânica desde a pré-história (Ferguson *et al.*, 1994). A difusão da *Olea europaea* na Península Ibérica terá ocorrido por volta de 900 a.C., pelos Fenícios, através do método de enxertia no zambujeiro, que figurava na vegetação espontânea (Paquete, 2009).

A oliveira mostrou ao longo de toda a sua história que é, por excelência, uma árvore que se adapta aos terrenos mais ingratos (Moreaux, 2002). Esta, dada a sua rusticidade, encontra-se muitas vezes em terrenos onde nenhuma outra planta resistiria. Mas quando a oliveira é tratada como uma verdadeira cultura as produções aumentam em quantidade e, em comparação com situações extremas, também em qualidade (Casa do Azeite, 2013).

Extremamente vivaz, é uma espécie muito disseminada, presente nos cinco continentes visto que a sua readaptação é quase sempre conseguida quando o clima lhe é propício. Um verão quente e seco, uma estação fria atravessada por transições pluviosas, mas ao abrigo de geadas demasiado fortes, garantem uma boa adaptação e a promessa de uma colonização espontânea (Moreaux, 2002).

Qualquer que seja a estação do ano, a oliveira permanece sempre verde, mesmo quando as dimensões e formas variam segundo as condições climáticas, a natureza do solo, a exposição, as cultivares e os modos de cultivo (Moreaux, 2002). A oliveira é uma árvore perene de longa duração e sabe-se que algumas espécies viveram até 1000 anos (Ferguson *et al.*, 1994).

Na sua forma geral, a oliveira é uma árvore de porte médio, muito resistente, com raízes que atingem os 6 metros, sendo conhecidas cerca de 400 espécies. Tem crescimento lento e normalmente só entra em produção a partir do quinto ano (Casa do Azeite, 2013).

A transformação e melhoria das características da oliveira foram conseguidas pelo homem, ao longo dos tempos, até se obter a árvore a que chamamos hoje a oliveira cultivada (Casa do Azeite, 2013).

Dentro desta espécie *Olea europaea L.* encontram-se diversos grupos de cultivares, espalhados por diferentes zonas oleícolas.

As cultivares de maior importância utilizadas em Portugal são a Galega vulgar, a Carrasquenha, a Cordovil, a Cobrançosa e a Verdeal (Casa do Azeite, 2013).

Em média, uma oliveira dá 20 Kg de azeitonas, sendo necessários cerca de 5 a 6 Kg para produzir 1 L de Azeite (Casa do Azeite, 2013).

2.1.2) Exigências do cultivo de oliveira

O cultivo da oliveira divide-se em três tipos de exigências: clima, solo e irrigação.

Clima:

Antes de plantar as oliveiras deve-se estudar o clima da zona, para saber qual a melhor cultivar, para que seja mais frutífera e menos exposta às intempéries (Vicente, 1840).

Quanto ao clima a oliveira cultiva-se em climas temperados, quente e subtropical, ou seja, entre os 30 e os 45graus de latitude. A árvore cresce em regiões tropicais, mas não frutifica, a menos que a altitude intervenha para proporcionar um certo repouso vegetativo (Pansiot e Rebour, 1961).

A sua terra natal é a bacia do Mediterrâneo cujo clima se caracteriza pela suavidade do inverno, pela seca e altas temperaturas do verão e pelo outono e primavera curtos (Pansiot e Rebour, 1961).

- Temperatura: os olivais têm uma temperatura média anual compreendida entre 15 e 20ºC. As temperaturas máximas podem ultrapassar os 40ºC sem inconvenientes mas as temperaturas mínimas não devem descer abaixo dos -7ºC, temperatura a partir da qual a geada pode causar graves danos (Pansiot e Rebour, 1961).

  De acordo com Loussert & Brousse (1980), citado por Baptista (2003): As temperaturas inferiores a -12ºC causam estragos importantes nas folhas, ramos e tronco. Certas cultivares têm necessidade de um repouso vegetativo prolongado para que a floração e a frutificação sejam normais. Este repouso vegetativo é adquirido quando as temperaturas de Dezembro baixam até -1,3ºC e em Janeiro até -2ºC,

explicando assim a melhor produtividade dos olivais situados a uma altitude média de 200 a 400 m em relação aos localizados a altitudes inferiores.

- Geadas, degelo e queimaduras: durante o inverno caiem sobre as árvores: neves, granizos e orvalhos. Ao longo das noites e dias durante as grandes geadas, vai-se dando sucessivos congelamentos e degelos das geadas. Estes consecutivos degelos e geadas queimam as árvores. Quando as árvores são atacadas na extremidade das suas raízes, podem considerar-se perdidas (Vicente, 1840).
- Pluviosidade: o solo e a pluviosidade são fatores de produção intimamente relacionados. O facto de um solo ser favorável ao armazenamento da água da chuva é benéfico para o cultivo em sequeiro, especialmente se a pluviosidade não superar os 200 mm por ano (Pansiot e Rebour, 1961). A oliveira pode cultivar-se em sequeiro, sempre que a precipitação anual não seja inferior 400 ou 500 mm, o que equivale 4000 ou 5000 m^3 de água por hectare (Baptista, 2003).
- Humidade atmosférica: uma elevada humidade é desfavorável ao cultivo das oliveiras. As névoas são prejudiciais para a floração. A baixa humidade das regiões continentais são um fator favorável mas aumenta a necessidade de água da chuva ou por irrigação (Pansiot e Rebour, 1961).

  A humidade relativa tem uma influência determinante no desenvolvimento de pragas, e muito particularmente de doenças, pelo que tem muita importância para a olivicultura e produção de azeite, já que o grau de acidez do azeite depende da sanidade das azeitonas de que é produzido (Costa, 1992).
- Altitude: as altitudes elevadas não são convenientes, não só pelos riscos de geadas, mas também por outros motivos como: o atraso na iniciação da atividade vegetativa e a precocidade com que termina (Pansiot e Rebour, 1961).

  Na região mediterrânea, não se deve ultrapassar os 800 m de altitude com exposição Sul e 600 m com exposição Norte (Baptista, 2003).
- Exposição solar: a oliveira é uma árvore ávida de luz e por isso prospera bem em zonas de muito sol (Pansiot e Rebour, 1961).

Solo:

Quanto à natureza do solo a oliveira é pouco exigente se disponibilizar uma quantidade suficiente de água (Pansiot e Rebour, 1961). Mas sabe-se que subsiste menos bem em

solos argilosos porque as suas raízes se estendem a partir da superfície, penetrando as fendas da argila (Vicente, 1840).

Os solos arenosos, possuem grande permeabilidade e pouca capacidade de retenção (5 a 6 % em relação com terra seca), convêm á oliveira em zonas áridas (Baptista, 2003).

Os solos argilosos, são pouco permeáveis, porem tem um grande poder de retenção de água (20 a 30 % segundo o conteúdo e a natureza das argilas), mas a oliveira não se desenvolve corretamente neles (Baptista, 2003). Os solos com uma proporção elevada de argila e ou limo apresentam arejamento insuficiente (Baptista, 2003).

Nos solos arenosos, mal estruturados, a permeabilidade e o arejamento não são problema para o desenvolvimento do sistema radicular, o que não sucede nos solos argilosos (Baptista, 2003). Da estrutura do solo dependerá toda a atividade radicular. Os solos com má estrutura, devido à ausência de matéria orgânica tornam-se prejudiciais para a oliveira. Na época das chuvas, devido à má circulação de água e à ausência de oxigénio, provocam o apodrecimento das raízes por asfixia, à qual a oliveira è considerada uma espécie sensível (Baptista, 2003).

Irrigação:

A gestão da água em pomares é fundamental para a uniformidade da árvore e sustentação de altos rendimentos de qualidade superior. A má gestão da água põe um pomar em risco e pode ter um efeito negativo significativo nas receitas (Ferguson *et al.*, 1994).

As oliveiras são consideradas tolerantes à seca, pois têm um mecanismo através dos estomatos que lhe reduz a perda de água (transpiração) e embora essas adaptações lhes permitam sobreviver a condições secas, as oliveiras não produzem bem sem irrigação adequada (Ferguson *et al.*, 1994). Julho e Agosto são os meses em que normalmente as oliveiras precisam de mais água, pois a humidade do solo insuficiente durante estes meses pode reduzir o crescimento de ramos e a produção de hidratos de carbono (Ferguson *et al.*, 1994).

Irrigação em excesso é muito prejudicial, solos mal drenados ou em camadas podem tornar-se alagados, resultando em pobre aeração e deterioração raiz. Isso é mais comum no inverno e início da primavera, causando o crescimento de ramos pobres, folhagem amarela, e, finalmente, a perda de árvore. Solo saturado após a frutificação contribui para murchar a fruta (Ferguson *et al.*, 1994).

2.2) Azeitona

2.2.1) Cultivares

As cultivares mais importantes utilizadas em Portugal são: "Galega vulgar", "Carrasquenha", "Cordovil", "Cobrançosa" e "Verdeal" (Vaz-Freire *et al.*, 2008).

- "**Galega vulgar**" é a uma cultivar rústica e é a mais cultivada em Portugal (Guerrero, 2003). A sua rusticidade e a sua boa adaptação a vários tipos de solo são as qualidades principais (Pansiot e Rebour, 1961). É muito produtiva e muito apreciada pela sua tolerância á seca, no entanto é sensível ao frio, á salinidade e ao calcário (Barranco *et al.*, 2001).

As cultivares de azeitonas existentes podem ter várias aptidões, por exemplo aptidão para azeite, para azeitona de mesa ou aptidão dupla, e esta cultivar tem aptidão dupla (Piçarra, 2002). Os frutos quando estão maduros, apresentam uma cor preta azulada (como mostra a figura 1) e a polpa é violeta muito escura. São suscetíveis ao ataque da mosca (*Dacus*) e de *Gloeosporium* (Pansiot e Rebour, 1961). Mas é resistente á verticulose (Barranco *et al.*, 2001).

A sua época de floração é média e a época de amadurecimento é muito jovem (Barranco *et al.*, 2001). Nas árvores que vegetam em boas condições o peso dos frutos varia entre 2 e 3 g, com um rendimento regular em azeite e este tem sabor agradável e bonita cor amarela. Esta cultivar tem boa propagação (Pansiot e Rebour, 1961). Tem alta resistência à remoção, tornando difícil a colheita mecânica (Barranco *et al.*, 2001).

Figura 1 – Azeitona Galega vulgar no estado de maturação maduro.
Fonte: (Barranco *et al.*, 2001)

Segundo um estudo de Peres *et al.*, (2006) para qualquer modo de produção (integrada ou biológica) a colheita mais precoce desta cultivar proporciona azeites mais resistentes à oxidação e não amargos.

Esta cultivar encontra-se na composição de quatro azeites DOP que são os DOP: Moura, Alentejo interior, Alto Alentejo e Ribatejo (Qualifica, 2009).

- **"Carrasquenha"** – cultivar com árvore pequena, de frutificação abundante e boa resistência a *Dacus*, mas susceptível a *Bacillus savastanoi*. Os seus frutos pesam de 2,5 a 4,5 g e são de polpa clara e de bom rendimento em azeite muito fino (Pansiot e Rebour, 1961).

- **"Cordovil"** – cultivar com árvore de grande porte, os frutos são elípticos, de 3 a 4 gramas, de cor verde-claro e que evoluem para preto vinhoso. O caroço é elíptico de superfície pouco rugosa. É medianamente resistente à mosca, mas muito sensível à tuberculose. A maturação é tardia. É uma cultivar de boas produções, com alto rendimento em azeite (CEPAAL, 2013).

- **"Cobrançosa"** – apresenta um bom rendimento em azeite. Este, é ligeira e medianamente frutado, com verde de erva acentuado, e de elevada riqueza em antioxidantes. Ligeiramente amargo e picante, quando as azeitonas estão verdes, mas "doce" e suave quando proveniente de azeitonas maduras (Fundação Eugénio de Almeida, 2013).

- **"Verdeal"** – esta cultivar dá uma árvore vigorosa e produtiva, mas não se adapta bem a todos os solos. Tem maturação tardia e os seus frutos têm um peso médio de 3 a 5,5 g, dão bom rendimento em azeite muito fino e de cor verdosa. Esta cultivar oferece mais resistência que a cultivar "Galega vulgar" a *Bacillus savastanoi*, *Gloeosporium*, *Dacus* e ao frio (Pansiot e Rebour, 1961).

2.2.2) Composição da azeitona

O fruto da oliveira, a azeitona, é uma drupa, botanicamente semelhante a: damasco, cereja, nectarina, pêssego e ameixa. A azeitona é constituída por epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo é a pele da azeitona, o mesocarpo que é o tecido comestível (a polpa da azeitona) e o endocarpo está formado pelo caroço que protege a semente

(Ferguson *et al.*, 1994 ; Guerrero, 2003). A forma, o tamanho dos frutos e a morfologia variam muito entre as cultivares (Ferguson *et al.*, 1994).

De acordo com Curci, (2001), citado por Baer (2006) a composição química da drupa pode resumir-se da seguinte maneira:

- água: 50%
- lípidos: 18 a 25%
- proteínas: 1,6%
- hidratos de carbono: 19 a 20%
- fibra: 5 a 6%
- cinza: 1,5%

A azeitona contém altas concentrações de compostos fenólicos, variando entre 1 e 3 % do peso da polpa fresca e o principal composto fenólico é a oleuropeína (Baer, 2006).

Quando o fruto está completamente desenvolvido, a polpa representa 70 a 90 %, e o caroço 9 a 27 % do peso total do fruto. Os componentes maioritários da polpa e do caroço são a água e o azeite. Na polpa a água e o azeite têm uma relação inversa entre si (Barranco *et al.*, 2001).

2.2.3) Maturação da azeitona

O conteúdo de azeite nos frutos aumenta á medida que avança a maturação, alcançando o seu máximo no momento que desaparecem os frutos verdes da árvore. A partir deste momento a quantidade total de azeite armazenado no fruto permanece constante (Guerrero, 2003).

Durante a maturação da azeitona ocorrem uma série de alterações, algumas das quais são usadas como indicadores de fim da maturação. Um parâmetro que pode indicar a evolução da maturação é a variação da cor do fruto. A azeitona, no início do processo de amadurecimento tem cor verde, depois passa a amarelado como consequência de uma forte redução do conteúdo em clorofila: esta fase é chamada a "maturação verde". Depois começa a acumulação de antocianas e a concentração destas nas células determina a intensidade da cor, que pode ir do avermelhado ao violáceo intenso e ao preto. Considera-se período de maturação o tempo decorrido desde o aparecimento das manchas violáceas á coloração definitiva da pele. O período de maturação varia, pois é afetado pelas condições climáticas e pelas características varietais (Barranco *et al.*, 2001).

Apesar das alterações que ocorrem durante a maturação variarem de acordo com a cultivar, clima e condições de crescimento da azeitona, pode-se dizer que o perfil de ácidos gordos modifica-se, o teor de polifenóis diminui e o teor de clorofilas reduz-se (Baer, 2006).

O conteúdo em polifenóis alcança um máximo quando a maioria dos frutos perde a cor verde e diminui com o avanço da maturação. Assim, o atributo amargo do azeite apresenta uma evolução semelhante dada a estreita relação entre os dois parâmetros (Baer, 2006).

De acordo com Hermoso et al, (1998), citado por Baer (2006) durante o período de maturação existem variações na composição dos frutos, responsáveis pela diminuição da estabilidade dos azeites que originam:

- diminuição da relação de ácidos gordos monoinsaturados / ácidos gordos polinsaturados: a composição acídica evolui observando-se uma diminuição na proporção de ácido palmítico e um aumento de percentagem de ácido linoleico, permanecendo constante a proporção de ácido oleico;
- o conteúdo de polifenóis varia, com um máximo que geralmente coincide com o momento em que se alcança o máximo de quantidade de azeite no fruto;
- o conteúdo de tocoferóis diminui ao longo do período de maturação e o conteúdo total de esteróis também tem tendência a diminuir.

2.3) Azeite virgem

O azeite virgem é muito apreciado desde a antiguidade pelo seu valor gastronómico, pelas suas características químicas, biológicas e organoléticas, mas também porque as suas propriedades preventivas e terapêuticas fazem dele uma gordura absolutamente insubstituível. O azeite é uma gordura essencialmente monoinsaturada, rica em ácido oleico, vitamina E e outros antioxidantes naturais (carotenos, polifenóis e tocoferóis) que ajudam o nosso organismo a defender-se dos "radicais livres" responsáveis pelo envelhecimento celular, prevenindo os efeitos nocivos da idade sobre as funções cerebrais e o envelhecimento dos tecidos e órgãos em geral. Pelo seu alto teor em ácidos gordos monoinsaturados, é também aconselhado na prevenção da diabetes, influenciando positivamente os valores de açúcar e gordura no sangue, e a nível ósseo favorece a mineralização, estimulando o crescimento e favorecendo a absorção do cálcio (Casa do Azeite, 2013).

Define-se azeite virgem como o azeite obtido a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos – em condições que não alterem o azeite – e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de acção química ou bioquímica ou por processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza (Regulamento CE nº 1513/2001).

O azeite virgem pode-se classificar em três categorias principais, como apresenta a tabela 1.

Tabela 1 – Categorias para classificação do azeite.

Categoria:	**Acidez** (% ácido oleico)**:**	**Índice Peróxidos** (mEq O_2/kg)**:**	**K_{232}**	**K_{270}**	**^K**
Azeite virgem extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
Azeite virgem	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
Azeite lampante	> 2,0	> 20	> 2,60	> 0,25	> 0,01

Fonte: Regulamento UE nº 61/2011, anexo I.

Regiões produtoras de Azeite em Portugal

No sector alimentar, existem atualmente vários sistemas de certificação da qualidade dos produtos. Na União Europeia, a certificação relacionada com a área geográfica tem grande importância económica, representando uma forma de otimização e diferenciação na comercialização de produtos agroalimentares (Simões-Lopes *et al.*, 2006). Cultivares portuguesas com um grande interesse na indústria de azeite são as responsáveis pelos azeites de Denominação de Origem Protegida (DOP), onde predomina a cultivar Galega Vulgar (Vaz-Freire *et al.*, 2008).

Em Portugal, encontramos seis zonas de Denominação de Origem Protegida (DOP) para azeites virgem, que são: DOP Moura, DOP Alentejo Interior, DOP Alto Alentejo, DOP do Ribatejo, DOP Beira Interior, DOP de Trás-os-Montes. A classificação DOP significa que o azeite foi extraído de acordo com as regras estipuladas no caderno de especificações referentes a: cultivar de azeitona, condições de apanha e transporte para

o lagar, condições de laboração e características do produto final (Herdade do Esporão, 2013).

Em seguida, apresentam-se mais pormenorizadamente as DOP mais relevantes neste projeto, que são as do Alentejo:

- **Denominação de Origem Protegida de Moura:** A região de Moura, na margem esquerda do rio Guadiana, é muito conhecida pela produção de azeite, e a Denominação de Origem Protegida Azeite de Moura encontra-se consagrada pelo uso (Herdade do Esporão, 2013). Este azeite resulta da junção de três cultivares de azeitonas, nas seguintes proporções: Verdeal entre 15 e 20 % no máximo, a Cordovil entre 35 a 40% e a Galega vulgar na percentagem restante (Qualifica, 2009). Este azeite é muito frutado, amargo e picante, sendo de cor amarelo-esverdeado (Herdade do Esporão, 2013).

Os azeites de Moura têm baixa e muito baixa acidez e são ricos em ácidos monoinsaturados. Na extração deste azeite apenas se utilizam azeitonas colhidas em árvores em plena maturação (Paquete, 2009).

- **Denominação de Origem Protegida do Alentejo Interior:** Na outra margem do rio Guadiana, na região dos azeites do Alentejo Interior, existem condições de solo e clima muito particulares, resultando num ambiente natural que privilegia o desenvolvimento da oliveira. É uma região com uma gama de solos variada, todos ricos em cálcio e potássio, que influencia o porte e a produção de azeitona. O azeite tem cor amarela dourada ou esverdeada, aroma frutado suave (Herdade do Esporão, 2013).

É obtido por processos mecânicos, a partir dos frutos das cultivares Galega Vulgar, presente num mínimo de 60 %, Cordovil de Serpa e/ou Cobrançosa, presentes num máximo de 40 %. São toleradas outras cultivares num máximo de 5 %, com exclusão absoluta das cultivares Picual e Maçanilha (Qualifica, 2009).

- **Denominação de Origem Protegida do Alto Alentejo:** Nos azeites do Alto Alentejo, provenientes de algumas freguesias de Évora e dos concelhos de Estremoz, Borba e Reguengos de Monsaraz até Elvas, Campo Maior e Portalegre, a predominante Galega Vulgar junta-se à Carrasquenha e Redondil. Os azeites são ligeiramente espessos, com cor amarelo-ouro, por vezes esverdeados (Herdade do Esporão, 2013).

É obtido por uma mistura de cultivares de azeitonas nas proporções seguintes, um mínimo de 65 % da cultivar Galega, um máximo de 5 % para: Azeiteira; Blanqueta; Carrasquenha; Redondil e um máximo de 10 % de Cobrançosa (Regulamento CE nº 708/2005, anexo II).

2.3.1) Composição

A composição do azeite consiste em componentes maiores e componentes menores. Os componentes maiores são cerca de 98% do peso total do azeite, e incluem os gliceróis e ácidos gordos (Baer, 2006).

A fração denominada componentes maiores, é constituída essencialmente por triacilgliceróis e ácidos gordos livres (Baer, 2006). O facto de o azeite virgem ser constituído, maioritariamente por ácido oleico faz com que ocupe uma posição impar, relativamente aos outros óleos vegetais (Henriques *et al.*, 2001), uma vez que este ácido é menos susceptível à oxidação do que os ácidos linoleico e linolénico (Baer, 2006).

Os componentes menores, cerca de 2 % do peso, incluem polifenóis, compostos voláteis, hidrocarbonetos, entre outros (Baer, 2006). Mas é nestes componentes menores que se encontram em grande parte, as propriedades benéficas para a saúde (Baer, 2006) e que contribuem para manter a qualidade química e organolética do alimento (Henriques *et al.*, 2001).

A fração dos componentes menores do azeite, é solúvel em água, e é a principal responsável pelo valor biológico e nutricional do azeite, pelas características organoléticas e pela sua resistência á oxidação (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*).

Os principais compostos dos componentes menores do azeite são (Baer, 2006):

Álcoois alifáticos – que podem derivar dos ácidos gordos por conversão do grupo carboxilo e hidroximetilénico (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*);

Ceras – são ésteres de um álcool alifático monovalente superior com um ácido gordo de alto peso molecular (*de acordo com Curci (2001), citado por Baer (2006)*);

Compostos fenólicos – ou polifenóis que é o termo mais usado para definir aquelas substâncias que possuem um anel de benzeno ligado a um ou mais grupos hidroxilicos. A atividade antioxidante destes compostos é de grande interesse para a indústria alimentar (*de acordo com Tsimidou (1998), citado por Baer (2006)*). Dependendo de fatores como: cultivar, condições climáticas, maturação do fruto, método de extração, entre outros, a concentração de compostos fenólicos no azeite pode variar entre 50 e 800mg/kg (*de acordo com Gutfinger (1981), citado por Baer (2006)*). O azeite virgem é o único óleo vegetal com quantidades apreciáveis de substâncias fenólicas naturais, que lhe confere o gosto amargo e frutado e contribuem, em grande

parte, para a sua resistência à auto-oxidação e termo-oxidação (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*). Este sabor amargo dos compostos fenólicos no azeite virgem condiciona o seu flavour e constitui um atributo característico importante que pode influenciar a preferência do consumidor, porém a sua intensidade depende fortemente da cultivar e é particularmente forte nos azeites provenientes de frutos imaturos (Fernandes *et al.*, 2001).

Fosfolípidos – como lectina e a cefalina, que fazem parte das membranas e dos transportadores das lipoproteínas (*de acordo com Gouveia (1996), citado por Baer (2006)*);

Hidrocarbonetos – formam-se como produtos colaterais durante a síntese dos ácidos gordos e compreendem o esqualeno e o β-caroteno (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*);

Pigmentos – substâncias corantes representadas pelos carotenoides e pelas clorofilas (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*);

Substâncias de natureza terpénica e esterólica – que podem ter a mesma origem, o esqualeno, de que derivam as aminas que se transformam em álcoois bifuncionais, eritrodiol e uvaol (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*).

Substâncias responsáveis pelo cheiro e sabor – compostos voláteis e alguns compostos fenólicos. Existem muitos compostos do aroma do azeite, como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, fenóis, entre outros. Para o cheiro a azeite existem menos compostos realmente responsáveis (*de acordo com Ribeiro (2005), citado por Baer (2006)*).

Tocoferóis – são antioxidantes de natureza fenólica, quase sempre na forma livre, mas podendo apresentar-se sob a forma esterificada com um ácido gordo (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*).

Vitaminas – as principais vitaminas lipossolúveis presentes no azeite são a vitamina A ou retinol, a vitamina D ou calciferol, a vitamina E ou a-tocoferol e a vitamina K (*de acordo com Gouveia (1995), citado por Baer (2006)*).

A composição em antioxidantes naturais do azeite depende, fundamentalmente, de dois grandes grupos de fatores: os intrínsecos, não modificáveis pelo homem, que incluem os fatores genéticos e as condições edafoclimáticas; e os extrínsecos, controláveis pelo homem, que compreendem as técnicas culturais, a colheita e os sistemas de extração (Gouveia *et al.*, 2003).

2.3.2) Processo de extração

Tal como refere Barranco *et al.*, (2001), para se iniciar o processo de extração do azeite primeiro ocorrem as chamadas operações preliminares exteriores, tais como: a colheita da azeitona, a separação, a limpeza e o seu transporte para o lagar. Posteriormente ocorrem as operações preliminares interiores, que são: a receção e descarga da azeitona, o controlo e classificação da mesma, seguido de limpeza, lavagem e pesagem.

Depois inicia-se a extração propriamente dita através das seguintes etapas:

- **Moenda** – faz a transformação da azeitona numa massa, através de mós ou galgas, ou através de estruturas metálicas, normalmente moinhos de martelos (CEPAAL, 2013). É efetuada para destruir os tecidos vegetais que formam a azeitona e assim libertar os glóbulos de azeite, possibilitando a sua futura aglomeração (Barranco *et al.*, 2001).

- **Batimento** – Nesta etapa do processo de transformação a massa sofre um batimento lento e contínuo, com um suave aquecimento (baixas temperaturas, entre 25 a 30ºC), uniformizando-se e proporcionando a junção das pequenas gotículas de azeite (CEPAAL, 2013). O batimento lento da pasta das azeitonas moídas facilita a reunião dos glóbulos de azeite em gotas de maior tamanho e ainda em porções da fase oleosa continua desligada dos sólidos da pasta e fase aquosa. A viscosidade do azeite varia em função da temperatura, pelo que uma elevação da temperatura faz com que se obtenham rendimentos maiores, no entanto um aquecimento excessivo dos azeites provoca alterações significativamente prejudiciais na sua qualidade, pois os componentes voláteis que contribuem para o bom aroma dos azeites degradam-se rapidamente a temperaturas altas (Barranco *et al.*, 2001).

- **Separação solido-liquido** – pode ser conseguida por prensagem ou por centrifugação da massa (CEPAAL, 2013).

Extração por pressão – que é a forma tradicional de separar as fases sólida da líquida pela prensa hidráulica (Barranco *et al.*, 2001).

Extração por Centrifugação (centrífuga horizontal ou decanter) – separação da fase sólida da líquida por utilização da força centrifuga. Ao submeter a pasta à ação da força centrífuga os sólidos encostam-se á parede interior do rotor e são arrastados por um torno sem-fim para um extremo. Os líquidos (azeite e fase aquosa) formam anéis concêntricos mais interiores segundo as suas densidades e são enviados para o exterior

por orifícios diferentes no sistema centrifugo de três fases ou a água sai juntamente com o bagaço no sistema centrífugo de duas fases, separado do azeite (Barranco *et al.*, 2001).

- **Separação líquido-líquido** por (Barranco *et al.*, 2001):

Decantação – decantação natural das fases líquidas, baseia-se nas diferenças de densidade dos líquidos. Esta separação realiza-se com uma serie de depósitos de alvenaria, revestidos a azulejos e ligados entre si, ou de fibra de vidro ou de aço inoxidável. Os fatores a ter em conta para ter bons resultados são: temperatura, limpeza, adição de água e tempo.

Centrifugação (centrífuga vertical) – a decantação natural necessita de muito espaço e muitos poços e demora muito tempo o que poderia originar fermentações, alterações de qualidade e deficiências nas características organoléticas. As separadoras centrifugas permitem separar as fases de forma contínua e mais rápida. Fatores a ter em conta são a homogeneidade do líquido a centrifugar, o caudal de alimentação, temperatura, caudal de água de adição e o tempo de trabalho entre as descargas.

- **Filtração** – é um processo facultativo, usado para retirar partículas da polpa de azeitona que possam estar em suspensão (CEPAAL, 2013). Este permite uma finalização mais rápida do produto e uma extensão do seu tempo de prateleira (Bubola *et al.,* 2012).

- **Armazenagem do azeite** – os depósitos devem ser de material totalmente impermeável e fácil de limpar e devem manter-se a uma temperatura entre 15 e 18ºC, evitando alterações térmicas que congelem o azeite se forem muito baixas ou que oxidem o azeite se forem muito altas (Barranco *et al.*, 2001).

2.3.3) Evolução da produção

De acordo com o anuário agrícola de 2011, onde o Ministério da Agricultura publicou os dados das produções de azeite até ao ano 2009, verifica-se que, apesar de alguns aumentos e decréscimos, a produção de azeite nos anos de 2007, 2008 e 2009 tem vindo a aumentar, especialmente na região do Alentejo (MAMAOT/GPP, 2011).

Segundo MADRP/GPP (2007), o olival para azeite na região do Alentejo representa 41,7% do total nacional de olival para azeite, ocupando 11,9% da superfície agrícola do Alentejo.

Nas últimas duas campanhas (2010/11, 2011/12), de acordo com os dados publicados pelo Ministério da Agricultura/GPP, foi no Alentejo que se extraiu a maior parte do azeite do país. Em ambas as campanhas, a extração de azeite nesta região foi superior a 50% em relação ao total nacional (MADRP/GPP, 2011 e MAMAOT/GPP, 2012).

A cultivar Galega vulgar predomina em praticamente todas as regiões. No Alentejo, a expressão da Galega vulgar, comparativamente às outras regiões detentoras desta cultivar, é da ordem dos 51 % (MADRP/GPP, 2007).

Tal como mostra a figura 2 do portal do azeite (2012), Portugal, em 2011, produziu mais 44 % que a média dos três anos anteriores.

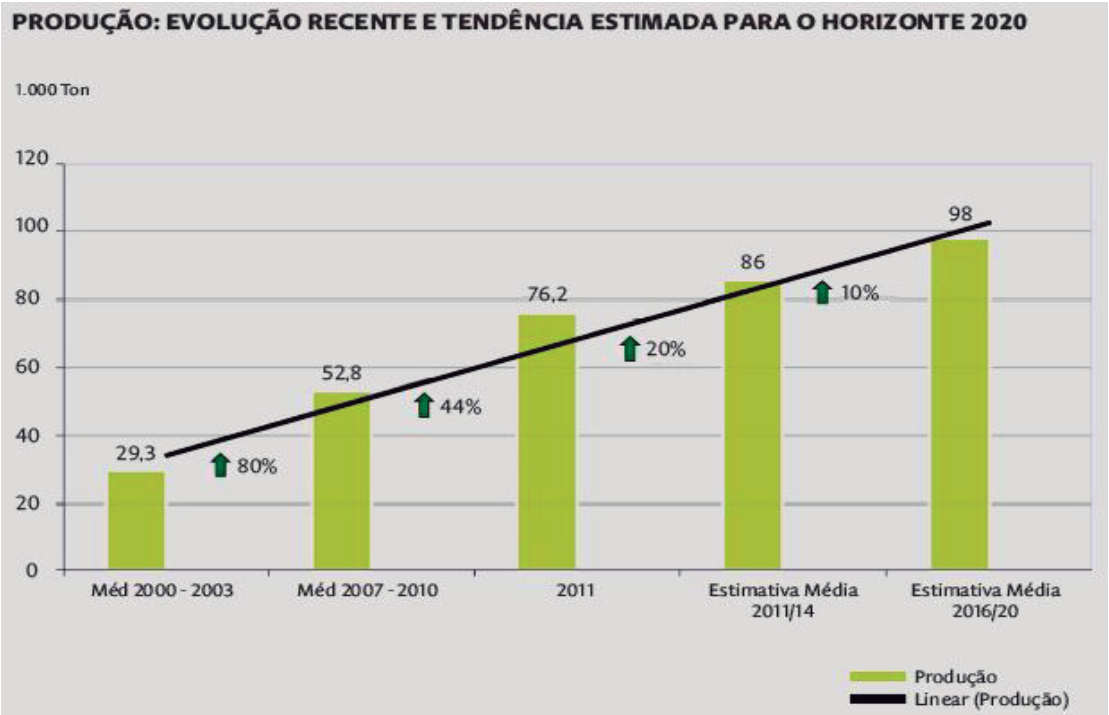


Figura 2 – Produção de azeite em Portugal
Fonte: Portal do Azeite, 2012

2.4) Polifenóis

A elevada resistência á deterioração oxidativa manifestada pelo azeite virgem é devida, principalmente, a duas razões: a sua composição em ácidos gordos e à presença de

compostos com uma poderosa atividade oxidante, como os polifenóis (Baer, 2006). Assim, o processo de oxidação do azeite virgem pode ser atrasado pelos antioxidantes (Servili *et al.*, 2009).

Os polifenóis atuam oxidando-se e bloqueando a fase de propagação da reação de oxidação. Também complexam os metais, tornando-os inativos como catalisadores da reação (Baer, 2006).

O poder antioxidante dos polifenóis é devido essencialmente ao hidroxitirosol e à aglicona da oleuropeína, embora também outros contribuam para a estabilidade do azeite (*de acordo com Gutiérrez et al. (2001) citado por Baer, (2006*).

A azeitona contém altas concentrações de compostos fenólicos, variando entre 1 e 3% do peso da polpa fresca (Baer, 2006). A classe de fenóis presente nas azeitonas inclui numerosas substâncias, tais como compostos fenólicos simples como: ácidos vanílico, gálico, caféico e cumárico, tirosol e hidroxitirosol, bem como compostos mais complexos como: secoiridóides (Oleuropeína e ligstroside), e lignanas (1-acetoxypinoresinol e pinoresinol) (Marini *et al.*, 2011).

Polifenóis, como a oleuropeína, tirosol, hidroxitirosol e oleocantal, encontrados no azeite, são antioxidantes extremamente fortes. A sua atividade antioxidante é comparável com a dos antioxidantes artificiais, como o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT), que são conhecidos pelas funções benéficas que desempenham na nossa saúde (Hatzakis, 2012).

A composição fenólica dos azeites é bastante complexa e a sua concentração média depende de vários fatores, como por exemplo o estado de maturação, a cultivar, as condições de armazenamento, condições climáticas e do tipo de tecnologia utilizada na sua extração (Costa, 2012).

De um modo mais simples, pode-se dizer que estes compostos encontram-se divididos em diferentes categorias, tais como os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, secoiridóides, flavonas e lignanas (Costa, 2012).

O grupo dos ácidos fenólicos, presente em pequenas quantidades, foi o primeiro a ser descrito no azeite, e divide-se em dois tipos:

a) benzóico (ácido benzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatequico, ácido gálico, ácido vanílico e ácido siríngico) e

b) cinâmico (ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico).

O grupo dos álcoois fenólicos é composto maioritariamente pelo hidroxitirosol e tirosol.

Os secoiridóides, juntamente com as lignanas, são os mais abundantes no azeite virgem extra, e apresentam-se na forma dialdeídica do ácido decarboximetil elenóico ligado ao hidroxitirosol ou tirosol, isómeros das aglíconas da oleuropeína (princípio amargo da azeitona encontrado no azeite) e ligstrosídeo.

Relativamente às lignanas, foram identificadas especificamente dois compostos, nomeadamente pinoresinol e acetoxipinoresinol.

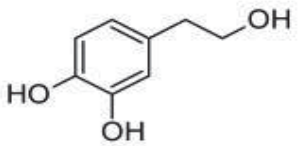
Por último, podem ser encontradas diferentes tipos de flavonas, tais como apigenina ou luteolina (Costa, 2012).

Em seguida, será apresentada de forma mais pormenorizada os quatro padrões de polifenóis que vão ser analisados por HPLC neste projeto: ácido gálico, hidroxitirosol, ácido cafeico e oleuropeína.

2.4.1) Hidroxitirosol:

O hidroxitirosol (representado na figura 3) é um antioxidante muito forte, considerado como o composto natural com a maior atividade antioxidante até agora identificado (Sousa *et al.*, 2012).

Este é um dos principais compostos fenólicos naturais presentes na azeitona, no azeite virgem, nas azeitonas de mesa, e nos resíduos gerados durante o processamento do azeite (Romero *et al.*, 2002).



Hydroxytyrosol

Figura 3 - Hidroxitirosol
Fonte: Omar, 2010.

2.4.2) Oleuropeína:

A oleuropeína (representado na figura 4) é geralmente o composto fenólico mais proeminente em cultivares de azeitona (Omar, 2010). Esta, altamente concentrada na

azeitona verde, é hidrolisada durante a maturação e durante o armazenamento após a colheita, produzindo várias moléculas mais simples, que caracterizam o sabor rico e complexo do azeite (Costa, 2012).

Os principais compostos fenólicos (hidroxitirosol e oleuropeína) provocam no azeite extra virgem o sabor amargo e o sabor picante (Omar, 2010).

No desenvolvimento do fruto da oliveira, três fases são geralmente distinguidas: uma fase de crescimento, durante a qual ocorre acumulação de oleuropeína, uma fase de maturação verde, que coincide com uma redução nos níveis de clorofila e de oleuropeína, e uma fase de maturação negro que é caracterizada pelo aparecimento de antocianinas e durante o qual os níveis de oleuropeína continuam a cair (Omar, 2010).

Tem sido muito difundido que a oleuropeína é o principal composto fenólico nas azeitonas e que a sua concentração decresce com o amadurecimento, mas isso depende da cultivar de azeitona (Romero *et al.*, 2002).

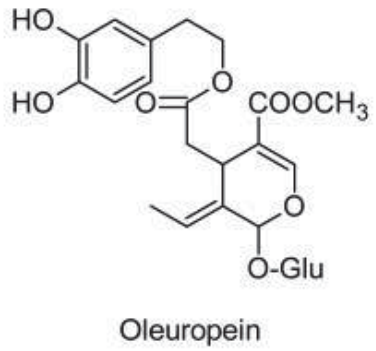


Figura 4 - Oleuropeína
Fonte: Omar, 2010.

2.4.3) Ácido Gálico:

O ácido gálico (figura 5) puro é um pó orgânico cristalino incolor. Este encontra-se como uma molécula livre ou como parte de uma molécula de tanino. Este ácido é encontrado em quase todas as plantas, mas é em uvas, lúpulo e casca de carvalho, que são mais conhecidas as suas elevadas quantidades (Phytochemicals, 2013).

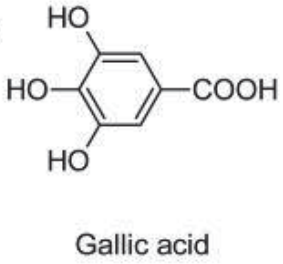
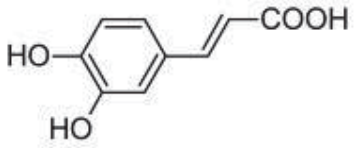


Figura 5 – Ácido Gálico
Fonte: Omar, 2010

2.4.4) Ácido Cafeico:

Segundo um estudo efetuado por Papadopoulos e Boskou (1991), onde testavam o efeito antioxidante de alguns compostos do azeite, verificaram que o hidroxitirosol e o ácido cafeico (representado na figura 6) mostraram fator de proteção maior do que o BHT.



Caffeic acid

Figura 6 – Ácido Cafeico
Fonte: Omar, 2010

Azeites ricos em compostos fenólicos são de uma maneira geral amargos e picantes. Geralmente os azeites extraídos a partir de azeitonas em estados de maturação menos avançados obtêm melhores classificações devido ao seu aroma "frutado", "floral" e complexo, oriundo do seu alto teor de fenóis. Em síntese, os elevados níveis de fenóis conferem aos azeites uma elevada estabilidade e um sabor frutado forte (Costa, 2012).

A figura 7, representa o nível de polifenóis e cor das azeitonas durante as várias estações (Agbiolab, Inc., 2009).

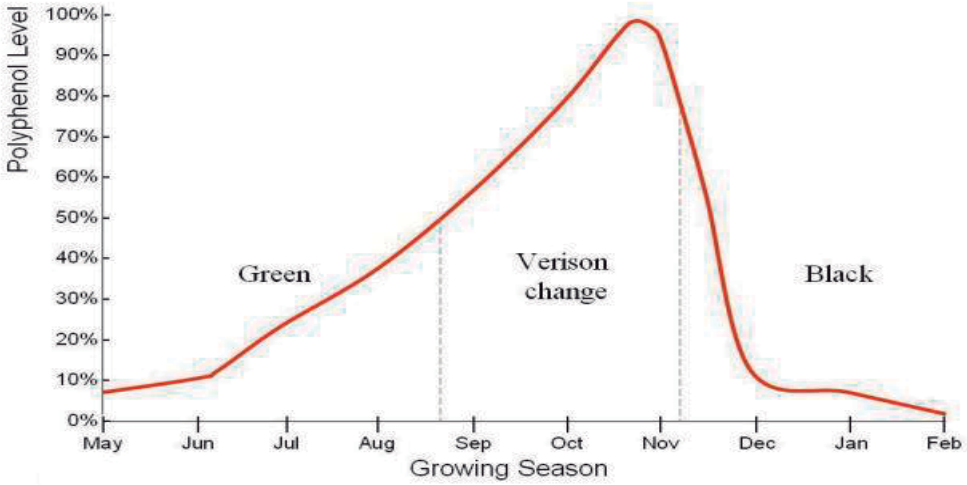


Figura 7 – Evolução dos polifenóis ao longo do tempo

2.5) Metodologia: HPLC

Sob a designação geral de cromatografia agrupam-se todos os processos analíticos que, através dos fenómenos de adsorção ou participação têm lugar entre duas fases não miscíveis, conduzem á separação total ou parcial dos componentes de uma mistura. De um modo geral uma das fases é estacionária, líquida ou sólida e a outra move-se através daquela em contacto íntimo e com fluxo intensivo, podendo ser líquida ou gasosa (Neves, 1980).

A combinação de todas as possibilidades conduz a quatro métodos cromatográficos possíveis (Neves, 1980):

- Cromatografia gás-líquido;
- Cromatografia gás-sólido;
- Cromatografia líquido-líquido;
- Cromatografia sólido-líquido.

HPLC é a designação mais comum de "High Pressure Liquid Chromatography", ou seja, Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Esta técnica não é recente, as suas condições essenciais foram estabelecidas por Martin e Synge em 1941, mas só recentemente a sua realização experimental se foi estabelecendo e difundindo (Vital, 2002).

Nesta técnica de separação os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases, uma estacionária e outra móvel que se desloca numa determinada direção (Vital, 2002).

A HPLC utiliza uma fase móvel líquida, ou eluente, para separar os componentes de uma mistura, os quais, são inicialmente dissolvidos num solvente e posteriormente forçados a passar por uma coluna cromatográfica a elevada pressão, onde ocorre a separação propriamente dita dos componentes. A fase estacionária é definida como um material imóvel que existe na coluna (Vital, 2002).

As substâncias presentes na amostra, devido às suas diferenças estruturais moleculares e grupos funcionais, dispõem de distintos graus de afinidade com as fases móvel e estacionária pelo que as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica, que é visualizada num

cromatograma pelo aparecimento de diversos picos. A identificação das substâncias pretendidas é, em geral, conseguida através do tempo de retenção (Vital, 2002).
A cromatografia líquida de alta pressão é basicamente uma forma altamente melhorada de cromatografia de coluna, em que em vez do solvente escorrer através da coluna por gravidade, é forçado através de pressões elevadas até 400 atmosferas. E isso torna o processo muito mais rápido (Clark, 2007).

Há duas variantes em uso em HPLC, dependendo da polaridade relativa do solvente e da fase estacionária (Clark, 2007):

a) **HPLC de fase normal:**

É o mesmo que cromatografia em camada fina ou cromatografia em coluna. Neste, enche-se a coluna com partículas de sílica e o solvente é não-polar, como hexano, por exemplo. Os compostos não polares passam mais rapidamente na coluna. Não é a forma mais comummente utilizada de HPLC.

b) **HPLC de fase reversa:**

A sílica é modificada para se tornar não polar anexando longas cadeias de hidrocarbonetos. Usa-se um solvente polar como uma mistura de água e um álcool, como metanol. Os compostos não polares na mistura tenderão a formar atrações com os grupos de hidrocarbonetos, serão também menos solúveis no solvente devido à necessidade de romper as ligações de hidrogénio à medida que espremer entre as moléculas de água ou metanol, por exemplo. Gastam menos tempo na solução no solvente e isto diminui o seu caminho através da coluna. Isso significa que agora as moléculas polares vão viajar através da coluna mais rapidamente. O HPLC de fase reversa é o mais comummente utilizado.

A figura 8 ilustra o esquema de uma análise por HPLC, em seguida serão explicadas as várias etapas representadas neste esquema.

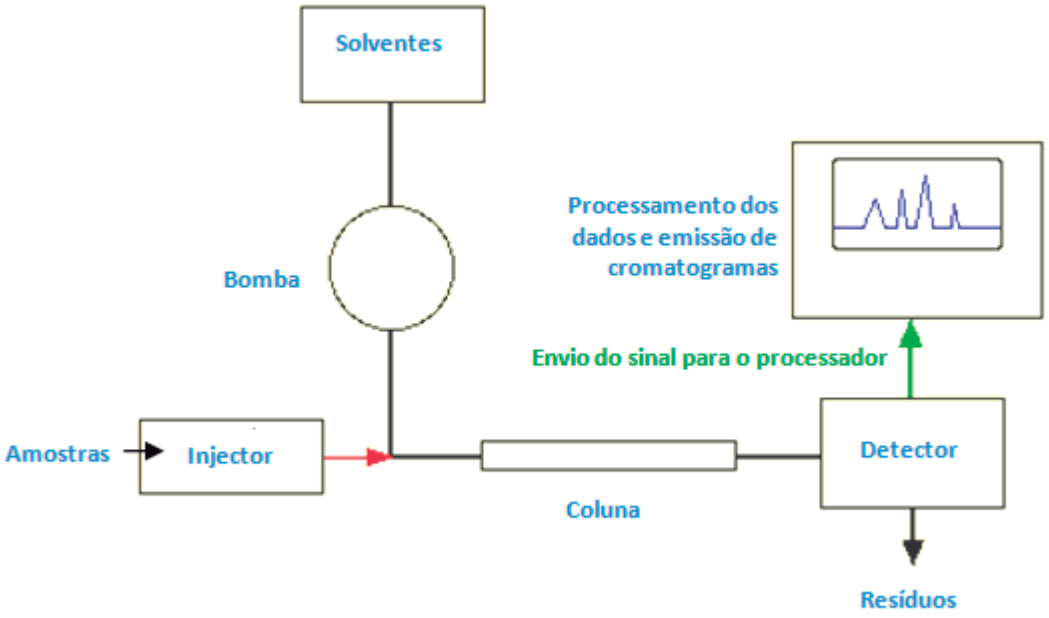


Figura 8 – Representação esquemática de uma análise de HPLC
Fonte: (Clark, 2007).

- **Injeção da amostra**

A injeção da amostra é um processo totalmente automatizado (Clark, 2007).

- **Tempo de retenção**

O tempo necessário para um determinado composto passar através da coluna para o detetor é conhecido como o seu tempo de retenção. Este tempo é medido a partir do momento em que a amostra é injetada para o ponto no qual o visor apresenta uma altura de pico máximo para esse composto. Os compostos têm diferentes tempos de retenção (Clark, 2007).

Para um composto em particular, o tempo de retenção variará dependendo da:

- pressão utilizada (porque afeta a taxa de fluxo do solvente);
- natureza da fase estacionária (não apenas o material de que é feita, como também o tamanho das partículas);
- composição exata do solvente;
- temperatura da coluna.

Isso significa que as condições têm de ser cuidadosamente controladas, se estiver a utilizar tempos de retenção como uma forma de identificação de compostos (Clark, 2007).

- **O detetor**

Existem várias formas de deteção quando uma substância passa através da coluna. Um método comum, que é fácil de explicar utiliza a absorção de ultravioleta. Muitos compostos orgânicos absorvem a luz UV em comprimentos de onda diferentes. Fazendo passar um feixe de luz UV através do fluxo de líquido que sai da coluna, e um detetor de UV no lado oposto do fluxo, é possível obter uma leitura direta da quantidade de luz absorvida. A quantidade de luz absorvida irá depender da quantidade de um composto particular que está a passar através do feixe no momento (Clark, 2007).

- **Interpretação do cromatograma**

Os resultados á saída do detetor serão gravados como uma série de picos - cada um representando um composto na mistura que passa através do detetor de luz e absorção de UV. Se já tiverem sido medidas amostras puras dos vários compostos sob condições idênticas às da análise podem usar-se os tempos de retenção para ajudar a identificar os compostos presentes. Mas também se podem usar os picos como uma forma de medir as quantidades de compostos presentes, se o interesse for medir um determinado composto, X. Se se injetou uma solução contendo uma quantidade conhecida de X puro no equipamento, pode-se gravar o seu tempo de retenção, mas também se pode relacionar a quantidade de X para o pico que foi formado. A área sob o pico é proporcional à quantidade de X, que passou no detetor, e esta área pode ser calculada automaticamente pelo computador ligado ao equipamento de análise (Clark, 2007).

CAPITULO III – PARTE EXPERIMENTAL

3.1) Caracterização das Amostras

3.1.1) Plano de amostragem utilizado

Os azeites virgens selecionados para este trabalho, são azeites virgem extra obtidos de azeitonas da cultivar Galega vulgar em dois estados de maturação através do processo de extração centrífugo de duas fases com temperatura de extração controlada entre os 25º e os 27ºC, em três lagares localizados em cada uma das margens do rio Guadiana. As amostras obtidas nos vários lagares foram recolhidas á saída da centrífuga vertical antes de seguirem para o depósito de armazenamento e enchimento. As amostras de azeite verde foram recolhidas no início de Novembro e as de azeite maduro no início de Dezembro.

Em cada lagar recolheram-se 3 amostras (como mostra a Figura 9) para garrafas de vidro escuro de 1000 ml que foram transportadas no mesmo dia para o Laboratório de Vinho e Azeite do IPBeja. Neste laboratório cada uma das amostras foi dividida em duas garrafas de vidro escuro de 500 ml e imediatamente congeladas a -20ºC, para garantir que as amostras não se alteravam até à sua análise. Em cada uma das amostras descongelou-se primeiro uma das duas garrafas a temperatura ambiente e efetuaram-se as análises de % de acidez, polifenóis totais, índice de peróxidos, absorvências a 232 e 270nm, pigmentos e viscosidade. Posteriormente descongelou-se a segunda garrafa para efetuar a análise em HPLC.

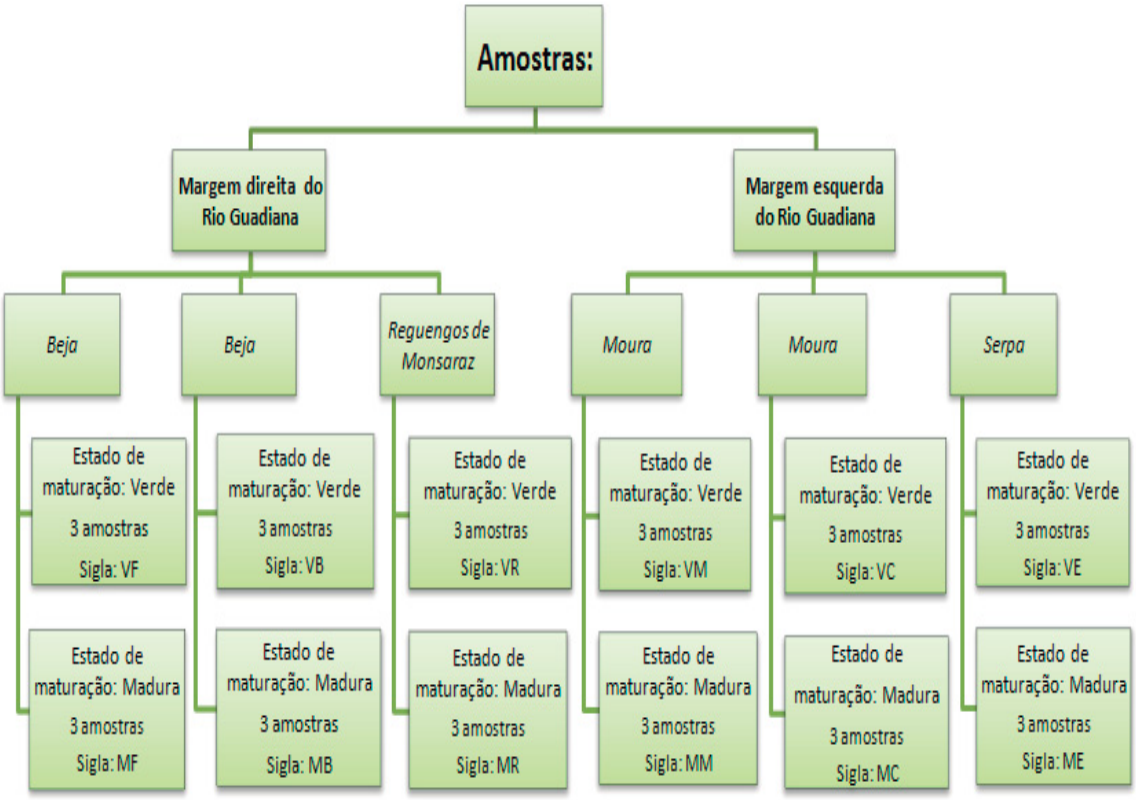


Figura 9 – Esquema das amostras em estudo

As amostras em estudo estão representadas pelas siglas indicadas na figura anterior, e estão identificadas na figura 10 que também referencia o Rio Guadiana, de modo a evidenciar as suas margens que é um dos fatores mais importantes em estudo. A figura identifica e descrimina as amostras mantendo a privacidade das empresas que as cederam; assim, não será referenciado o nome da empresa mas sim a freguesia onde se localiza. Também pela questão da privacidade das empresas posteriormente ao longo deste relatório serão sempre utilizadas as siglas das amostras.

Figura 10 – Representação no mapa das amostras em estudo divididas pelo Rio Guadiana
Fonte: Porto editora, 1998. Escala 1:1 775 000

Margem Direita Rio Guadiana:

- ***VF + MF*** – Freguesia de São Brissos, do concelho de Beja;
- ***VB + MB*** – Freguesia de Santa Maria da Feira, do concelho de Beja;
- ***VR + MR*** – Freguesia de Reguengos de Monsaraz do concelho de Reguengos de Monsaraz.

Margem Esquerda Rio Guadiana:

- ***VM + MM*** – Freguesia de São João Batista, do concelho de Moura;
- ***VC + MC*** – Freguesia de Santo Agostinho, do concelho de Moura;
- ***VE + ME*** – Freguesia do Salvador, do concelho de Serpa.

As análises: % de acidez, polifenóis totais, índice de peróxidos, absorvências a 232 e 270nm e pigmentos foram efetuadas no Laboratório de Vinho e Azeite do IPBeja; a análise de viscosidade foi efetuada no Laboratório de Leites e derivados do IPBeja e a análise de HPLC foi efetuada no Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL).

A todas as amostras foram efetuadas as análises indicadas em seguida:

1ª etapa: realização das análises químicas (Acidez; Polifenóis Totais; Índice de Peróxidos; Absorvências a 232 nm e 270 nm; Pigmentos e Viscosidade) para a

caracterização das amostras. Todas estas análises foram realizadas em duplicado, exceto a viscosidade que foi em triplicado.

2ª etapa: validação da técnica a utilizar para determinar por **HPLC** os principais compostos fenólicos presentes nestas amostras. Após a validação da mesma, esta efetua-se em todas as amostras com os padrões polifenólicos: hidroxitirosol, oleuropeína, ácido gálico e ácido cafeico, que são dos compostos fenólicos mais comuns em azeite virgem.

3ª etapa: estudo dos polifenóis presentes nas amostras através de:

- comparação da evolução fenólica com a maturação;
- comparação da composição fenólica das amostras obtidas nas margens esquerda e direita do Rio Guadiana.

3.1.2) Análises efetuadas - Materiais e Métodos

3.1.2.1) Reagentes:

Os reagentes químicos utilizados neste trabalho experimental foram os seguintes:

- Éter; Etanol; Fenolftaleína; Reagente Folin-Ciocalteau; Carbonato de Sódio; Iodeto de Potássio; Ciclohexano; Tiossulfato de Sódio; Hidróxido de sódio – marca: Panreac.
- Hexano; Metanol – marca: Fisher Scientific.
- Clorofórmio; Ácido Acético Glacial; Iso-Octano (trimetilpentano) – marca: Fisher Chemical.
- Amido solúvel – marca: Merck.

3.1.2.2) Equipamentos:

Todas as amostras foram pesadas numa balança da marca Mettler Toledo, modelo AB204-S, com a precisão de ± 0,0001g.

Para todas as análises com leituras espectrofotométricas no ultravioleta e no visível, utilizou-se o espectrofotómetro marca: Hitachi, modelo U-2000.

Para a viscosidade utilizou-se o viscosímetro Thermo Haake VT550, com sonda MV DIN e o banho a uma temperatura de 20ºC.
E o equipamento HPLC utilizado foi da marca Merck Hitachi LaChrom.

3.1.2.3) Análises:

A todas as amostras indicadas anteriormente, foram efetuadas as análises seguintes, no Laboratório de Vinho e Azeite do IPBeja:

- Percentagem de acidez

Efetuada de acordo com o Regulamento CEE nº 2568/91, anexo II. A figura 11 representa a realização desta análise.
A percentagem de acidez de um azeite resulta do grau de desagregação dos triacilgliceróis, devido a reações químicas de hidrólise ou lipólise, formando-se desta forma os ácidos gordos livres. Assim, a acidez não tem qualquer relação com o seu sabor, mas com fatores que incluem ataque de pragas e doenças, contacto prolongado da água com o azeite e ainda métodos de colheita, transporte, armazenamento e extração descuidados (Costa, 2012).
A percentagem de acidez mede a quantidade de ácidos gordos livres no azeite, e é expressa em % de ácido oleico. A acidez é uma anomalia que resulta essencialmente, do mau estado dos frutos e/ou de más condições de processamento (Santos, 2009). O azeite está apto para consumo até um valor máximo de acidez de 2,0% (Santos, 2009 e Regulamento UE nº 61/2011).

Figura 11 – Análise de percentagem de acidez
Fonte: Freitas, 2013

- Índice de Peróxidos

Esta análise efetua-se de acordo com a técnica descrita no Regulamento CEE nº 2568/91, anexo III. A realização desta análise está representada na figura 12.

O índice de peróxidos mede o estado de oxidação inicial do azeite, e também indica a deterioração que certos componentes, como as vitaminas, podem ter sofrido (Santos, 2009).

O limite para consumo está fixado em 20 miliequivalentes (mEq) de oxigénio activo por kg de azeite (Santos, 2009 e Regulamento UE nº 61/2011).

Figura 12 – Análise do índice de peróxidos
Fonte: Freitas, 2013

- Polifenóis Totais

Os polifenóis são considerados os principais compostos com atividade antioxidante presentes no azeite, dada a sua capacidade de doar um átomo de hidrogénio ao radical lipídico formado durante a fase de propagação da oxidação dos lípidos, contribuindo, assim, para a estabilidade do azeite (Baer, 2010). Devido a estas características esta análise efetua-se para quantificar os polifenóis presentes nas amostras.

Durante o amadurecimento do fruto ocorrem alterações importantes na sua constituição, nomeadamente a diminuição da proporção de ácido palmítico, polifenóis e tocoferóis e um aumento na proporção de ácido linoleico (Ramalheiro, 2009). O teor de polifenóis pode oscilar entre 50 e 200mg/kg, embora se possa encontrar azeites que chegam a ter 1000 mg/kg (Santos, 2009).

Esta análise foi efetuada pelo Método Interno do Laboratório de Vinho e Azeite do IPBeja, que se baseia numa leitura espectrofotométrica a 725nm após a reação da amostra com a solução Folin-Ciocalteau, tal como descrito em seguida:

- **Preparação da <u>solução de referência</u>**: Para um balão de 25 ml pipetar 14 ml de água destilada, 2,5 ml de mistura de metanol/água (6/4) e 1,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteau. Agitar e guardar na ausência de luz durante 3 minutos. Ao fim deste tempo, adiciona-se 4 ml de Na_2CO_3 a 20% e completa-se o volume com água destilada.
- **Preparação da <u>amostra</u>**: Pesar, rigorosamente, cerca de 10 g de azeite para um copo e dissolver em 25 ml de n-hexano 99%. Transferir para uma ampola de 100 ml. Fazer 3 extrações de 10 ml cada com a mistura metanol-água (6/4), agitando durante 30 segundos após cada adição. Após separação das fases, recolher os extratos para um balão volumétrico de 50 ml (como representa a figura 13). Completar com água destilada. Obtém-se, assim, o extrato fenólico. Para um balão de 25 ml, medir 14 ml de água destilada, 5 ml de extrato fenólico (com pipeta diferencial) e 1,25 ml do reagente Folin-Ciocalteau. Agitar energicamente e guardar na ausência de luz durante 3 minutos. Após este tempo, juntar 4 ml da solução de Na_2CO_3 a 20%, completar com água destilada.
- Colocar ao abrigo de luz durante 1 hora as amostras e a solução de referência. Ao fim deste tempo, fazer a leitura no espectrofotómetro, a 725 nm, usando uma célula de quartzo. Na célula de referência, usar a solução de referência preparada.

Figura 13 – Análise de polifenóis totais a aguardar a separação das fases e os balões de 50 ml para recolha das mesmas
Fonte: Freitas, 2013

O resultado expressa-se em mg/kg de azeite, com uma casa decimal, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Polifenóis Totais (mg/kg)} = \frac{(8{,}53993721 \times \text{leitura} - 0{,}24765388) \times 10 \times 25}{\text{peso da amostra}}$$

- Pigmentos

Determina-se de acordo com Minguez-Mosquera *et al.*, (1991), a partir da leitura espectrofotométrica de uma solução de azeite em ciclohexano, a 670 nm e 470 nm.

O azeite possui uma cor que vai desde o verde-amarelado até ao dourado, dependendo do estado de maturação dos frutos e da composição e conteúdo total de pigmentos presentes. Podem-se encontrar no azeite duas classes de pigmentos: os carotenoides e as clorofilas. Os principais carotenoides presentes no azeite são a luteína, o ß-caroteno, a violaxantina e a neoxantina. Os carotenoides, em particular o ß-caroteno, são eficientes antioxidantes. Normalmente, o conteúdo total de carotenoides varia entre 1 a 20 mg/kg (Santos, 2009).

As tonalidades esverdeadas do azeite estão associadas a maiores teores em clorofilas e as tonalidades alaranjadas aos carotenoides. Os pigmentos clorofilinos tendem a decrescer ao longo da maturação (Conceição *et al*, 2003).

Efetua-se de acordo com a técnica de Minguez-Mosquera *et al.*, (1991), que se traduz em dissolver e perfazer com ciclohexano 7,5 g de amostra num balão de 25 ml, e ler a 670 e 470 nm, como ilustrado na figura 14.

Figura 14 – Análise aos pigmentos
Fonte: Freitas, 2013

Os resultados expressam-se em mg de clorofila / kg de azeite e mg de carotenoides / kg de azeite, respetivamente:

$$\text{Clorofila (mg/kg)} = \frac{(A_{670} \times 10^6)}{(613 \times 100 \times d)}$$

$$\text{Carotenoides (mg/kg)} = \frac{(A_{470} \times 10^6)}{(2000 \times 100 \times d)}$$

Em que:

A = absorvência lida

d = espessura da célula espectrofotométrica (1 cm).

- <u>Absorvências a 232 e 270 nm</u>

Efetua-se de acordo com o Regulamento CEE nº 2568/91, anexo IX e está representada na figura 15. A análise por espectrofotometria no ultravioleta pode fornecer indicações sobre a qualidade de uma matéria gorda, o seu estado de conservação e as modificações devidas as processamento tecnológico (Regulamento CEE nº 2568/91).

A absorvência no ultravioleta (K270) utiliza-se especialmente para detetar os componentes oxidados anormais em um azeite virgem. Num azeite virgem obtido de uma azeitona sã, que não tenha sido submetido a nenhum tratamento diferente das operações físicas próprias da sua extração, o seu valor é geralmente inferior aos limites estabelecidos (Santos, 2009). Nos azeites virgem extra o valor limite é de 0,22, podendo este valor ir até a um máximo de 0,25 para o caso de azeites virgens (Santos, 2009 e Regulamento UE nº 61/2011).

Figura 15 – Análise de absorvências a 232 e 270 nm
Fonte: Freitas, 2013

- Viscosidade

Esta determina-se através do viscosímetro Thermo Haake VT550, com a sonda MV DIN e com o banho a uma temperatura de 20ºC, equipamentos ilustrados nas figuras 16a e 16b.

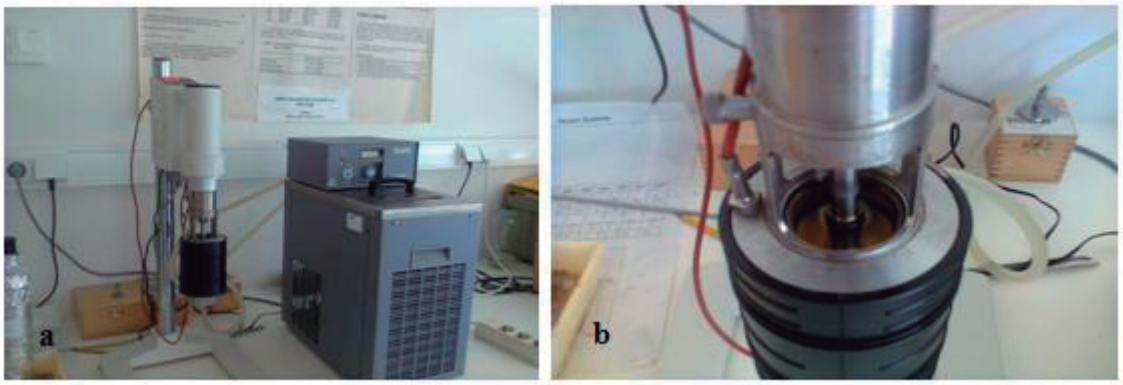


Figura 16 – Análise da viscosidade
Fonte: Freitas, 2013

No computador ligado ao viscosímetro encontra-se o programa que regista os gráficos de cada amostra e no qual se faz o tratamento dos gráficos de modo a obter o valor da densidade.

A viscosidade de um líquido traduz a sua resistência ao fluxo e surge das forças intermoleculares entre as moléculas. A viscosidade geralmente diminui à medida que a

temperatura sobe pois as moléculas têm mais energia a temperaturas elevadas. Quanto maior a viscosidade de um líquido, mais lentamente ele flui (Jones e Atkins, 1999).

3.2) Análise de polifenóis por HPLC

Um dos objetivos deste projeto é validar uma metodologia para identificar e quantificar os compostos fenólicos por HPLC. Para efetuar essa validação utilizou-se por base o método da Universidade de Huelva – Faculdade de Ciências Experimentais, que será adaptado às condições de análise e à coluna usada neste projeto. Esta metodologia efetua-se em 2 etapas: uma primeira de preparação da amostra e uma segunda de análise propriamente dita.

⇒ **Preparação da amostra**:

Para um eppendorf de 2 ml pesar 0,5 g amostra e juntar 500 µL de solução metanol/água (80%/20%). Agitar 1 minuto no vortex.

Centrifugar a 13400 rpm durante 5 minutos.

Retirar 400 µL do sobrenadante e filtrar para outro eppendorf. Retirar deste filtrado 150 µL para o vial e completar até 500 µL, ou seja, adicionar 350 µL de água ultra pura.

Do vial injetar 100 µL no HPLC para analisar.

⇒ **Análise**:

Manter a coluna a uma temperatura constante de 25ºC e efetuar a análise de acordo com as condições descritas em seguida:

⇒ **Condições analíticas**:

Volume de injeção: 100 µL;

Solvente A: 5% de Metanol, 2% de ácido acético glacial, e restante de água ultra pura;

Solvente B: 81,3% de Metanol, 1,7% de ácido acético glacial, e restante de água ultra pura;

Comprimento de onda: 280 nm;

Os volumes de solvente foram usados em gradiente de acordo com o descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Gradiente de solventes utilizados no método de base.

Tempo (minutos):	Solvente A (%):	Solvente B (%):	Fluxo (ml/min):
0,0	100	0	1,0
5,0	100	0	
50,0	60	40	
60,0	40	60	
65,0	25	75	
70,0	0	100	
80,0	100	0	
85,0	100	0	

3.3) Tratamento estatístico dos resultados

Os tratamentos estatísticos usados dependeram do ensaio e dos objetivos em causa, pelo que são justificados em cada sub capitulo antes de serem apresentados os resultados de cada tratamento estatístico. Nesta fase, pretende-se apenas fazer um pequeno resumo dos objetivos gerais de cada metodologia. Todos os tratamentos, tabelas e gráficos foram elaborados pelos "softwares" Microsoft Office Excel 2007 e Statistica 6.0.

3.3.1.) Análise descritiva e análise de variância

Para avaliar a qualidade dos resultados obtidos para cada um dos parâmetros foi usada estatística descritiva, através da determinação da média, desvio e erro padrão, bem como intervalo de confiança da média a 95%, por amostra. E para monitorizar a evolução das propriedades das amostras de azeite ao longo da maturação, foram efetuadas análises de variância a um fator (teste de Scheffé para comparação de médias). Os valores médios foram obtidos a partir de três amostras semelhantes e, em cada amostra, foram utilizadas entre 2 a 3 réplicas laboratoriais (dependendo do parâmetro). Assim, cada valor médio está associado a pelo menos seis repetições (n = 6).

3.3.2.) Análise de "box and whiskers" e análise em componentes principais

De modo a evidenciar as diferenças entre as amostras, efetuou-se a análise por gráficos de caixa ("box and whiskers") também para comparação dos resultados. Esta coloca em evidência dois fatores em estudo a margem do Rio e a maturação.

Este tipo de gráfico de caixa coloca uma caixa em torno do ponto médio (média), que representa um intervalo selecionado (erro padrão) e uma barra fora da caixa, que representa (desvio padrão).

A análise em componentes principais (ACP) é aplicada no sentido de resumir um grande número de variáveis (espaço multidimensional) num espaço com poucas dimensões (2 ou 3), sem se perder muita informação. A ACP é baseada na combinação linear das variáveis experimentais (atributos medidos), com variáveis artificialmente produzidas designadas por componentes principais (CP's), que formam um espaço ortogonal. Está em causa a redução de um espaço m-dimensional (variáveis originais) num outro com menor número de dimensões, uma vez que, apenas incorpora as componentes principais significativas. A primeira componente é a que contem maior variância associada, seguindo-se a segunda e assim sucessivamente, até perfazer m-componentes, cuja soma da variância é igual à soma da variância das variáveis originais (100 %). De facto, as m-variáveis originais têm valor próprio igual a 1, "pesam" todas o mesmo, enquanto que as m-componentes têm valor próprio diferente de 1. A primeira componente é a que tem maior valor próprio, seguindo-se a segunda, e assim sucessivamente, sendo o somatório do valor próprio das m-componentes, igual ao número de variáveis utilizadas na análise. A representação gráfica das variáveis que contribuem para a explicação das componentes principais, bem como as coordenadas das amostras no plano formado pelas componentes principais (projeção das amostras no plano principal), permite reconhecer correlações existentes entre variáveis originais e estabelecer grupos de amostras com comportamento semelhante (Alvarenga, 2008).

CAPITULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados das análises após tratamento estatístico e faz-se a sua discussão. No apêndice 1 encontram-se os resultados médios por amostra em cada análise.

4.1) Estatística descritiva e análise de variância dos resultados obtidos

Análise estatística efetuada para a verificação de diferenças significativas entre os resultados. Nesta análise estatística cada valor médio está associado a pelo menos seis repetições (n = 6) pois os valores médios foram obtidos a partir de três amostras semelhantes e, em cada amostra, foram utilizadas entre 2 (n = 6) a 3 (n = 9) réplicas laboratoriais.

Na tabela 3 apresentam-se os resultados médios obtidos bem como os resultados da análise de variância.

Tabela 3 - Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras.

			Polifenóis Totais (mg / kg azeite)	Índice de Peróxidos (meq O_2 / kg)	Acidez (% m/m ácido oleico)	Absorvências 232 nm	Absorvências 270 nm	Pigmentos Clorofilas 670 nm (mg / kg azeite)	Pigmentos Carotenoides 470 nm (mg / kg azeite)	Viscosidade (Pa.s)
Verde	Margem Esquerda	**VM**	141,65^{c} (7,904)	6,52^{b} (0,216)	0,206^{i} (0,014)	1,650^{cd} (0,010)	0,097^{e} (0,0026)	15,664^{c} (0,033)	5,435^{g} (0,029)	0,080^{a} (0,0016)
Verde	Margem Esquerda	**VC**	183,78^{b} (3,409)	4,25^{c} (0,245)	0,187^{i} (0,014)	1,675^{c} (0,013)	0,112^{e} (0,0066)	18,003^{a} (0,028)	6,383^{de} (0,029)	0,076^{a} (0,0072)
Verde	Margem Esquerda	**VE**	218,79^{a} (1,175)	6,24^{b} (0,336)	0,450^{d} (0,001)	1,639^{d} (0,004)	0,112^{e} (0,0041)	16,517^{b} (0,249)	6,695^{c} (0,015)	0,081^{a} (0,0035)
Verde	Margem Direita	**VF**	103,71^{f} (1,759)	5,62^{bc} (0,241)	0,486^{c} (0,015)	1,536^{f} (0,026)	0,115^{de} (0,0051)	15,315^{cd} (0,319)	4,373^{i} (0,028)	0,075^{a} (0,0065)
Verde	Margem Direita	**VR**	130,06^{d} (2,255)	6,10^{b} (0,277)	0,412^{e} (0,014)	1,557^{f} (0,005)	0,107^{ef} (0,0037)	15,158^{cd} (0,043)	4,946^{h} (0,028)	0,076^{a} (0,0054)
Verde	Margem Direita	**VB**	86,73^{g} (2,185)	6,48^{b} (0,345)	0,422^{de} (0,0008)	1,707^{b} (0,016)	0,123^{abcd} (0,0034)	14,769^{de} (0,559)	6,044^{f} (0,145)	0,0814^{a} (0,0016)
Maduro	Margem Esquerda	**MM**	136,60^{cd} (7,669)	6,77^{b} (0,516)	0,554^{b} (0,014)	1,542^{f} (0,006)	0,127^{ab} (0,0039)	13,151^{g} (0,045)	5,503^{g} (0,013)	0,0797^{a} (0,0036)
Maduro	Margem Esquerda	**MC**	116,33^{e} (2,359)	5,90^{b} (1,187)	0,272^{h} (0,014)	1,735^{b} (0,004)	0,122^{bcd} (0,0015)	14,095^{ef} (0,173)	7,455^{a} (0,016)	0,0799^{a} (0,0031)
Maduro	Margem Esquerda	**ME**	107,63^{ef} (2,813)	7,06^{b} (1,057)	0,309^{g} (0,0002)	1,778^{a} (0,004)	0,133^{a} (0,0024)	14,074^{f} (0,047)	7,012^{b} (0,076)	0,0808^{a} (0,0034)
Maduro	Margem Direita	**MF**	99,59^{f} (0,707)	5,58^{bc} (0,199)	0,729^{a} (0,0019)	1,543^{f} (0,003)	0,125^{abcd} (0,0014)	10,095^{h} (0,157)	6,669^{c} (0,105)	0,080^{a} (0,0014)
Maduro	Margem Direita	**MR**	73,77^{h} (1,351)	4,14^{c} (0,245)	0,356^{f} (0,014)	1,586^{e} (0,002)	0,116^{cde} (0,0007)	10,568^{h} (0,115)	6,168^{ef} (0,007)	0,0757^{a} (0,0056)
Maduro	Margem Direita	**MB**	78,07^{gh} (0,893)	10,43^{a} (0,729)	0,725^{a} (0,011)	1,708^{b} (0,007)	0,125^{abc} (0,0051)	13,755^{fg} (0,491)	6,398^{d} (0,201)	0,0818^{a} (0,0004)

a,b,c, … Médias na mesma coluna com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, n = 6, para a viscosidade n = 9 (teste de Scheffé).

Os valores médios de polifenóis totais dos azeites verdes da margem esquerda foram superiores aos valores médios dos azeites verdes da margem direita, havendo diferenças significativas ($P < 0,05$). Por outro lado mantendo a mesma margem (esquerda),

verificou-se que as amostras de azeite verde apresentavam valores superiores de polifenóis totais, quando comparadas com as amostras de azeite maduro, com diferenças significativas ($P < 0,05$) entre todas á exceção da amostra MM.

Quanto ao índice de peróxidos os valores revelam grande homogeneidade, pois não existem diferenças significativos ($P < 0,05$) á exceção da amostra MB que tem um valor muito superior às restantes, ainda que dentro dos limites legais para a categoria azeite virgem extra.

Na acidez, foi nas amostras provenientes da margem esquerda que se observaram os valores mais baixos tanto nos azeites verdes (como VM e VC com valores próximos de 0,20%) como nos maduros (como MC com valor próximo de 0,27%). Pelo contrário, as amostras com maior percentagem de acidez foram as dos azeites maduros provenientes da margem direita (como nas amostras MF e MB com uma % de acidez próxima de 0,7). Estes dois grupos de amostras apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Quanto às absorvências no UV, apesar de se terem observado algumas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre amostras, não se observou influencia da maturações nem das margens do rio.

Para os teores de pigmentos clorofilinos e carotenóides observou-se, em termos gerais, teores de clorofila com valores superiores em azeites verdes do que em azeites maduros (quase sempre com diferenças significativas ($P < 0,05$)); por outro lado os carotenoides apresentavam resultados inversos, ou seja, os valores mais elevados em azeites maduros do que em azeites verdes.

Quanto á viscosidade nenhum valor apresenta diferenças significativas ($P < 0,05$), existindo homogeneidade entre todos os resultados obtidos.

4.2) Comparação dos resultados obtidos nas diferentes maturações para as margens esquerda e direita do Rio Guadiana

4.2.1) Apresentação "box and whisker"

Os gráficos seguintes colocam em evidência os dois fatores em estudo (maturação e margem do Rio) para cada análise, demonstrando de forma sucinta as diferenças que na tabela anterior já se verificaram (figuras 17 a 20).

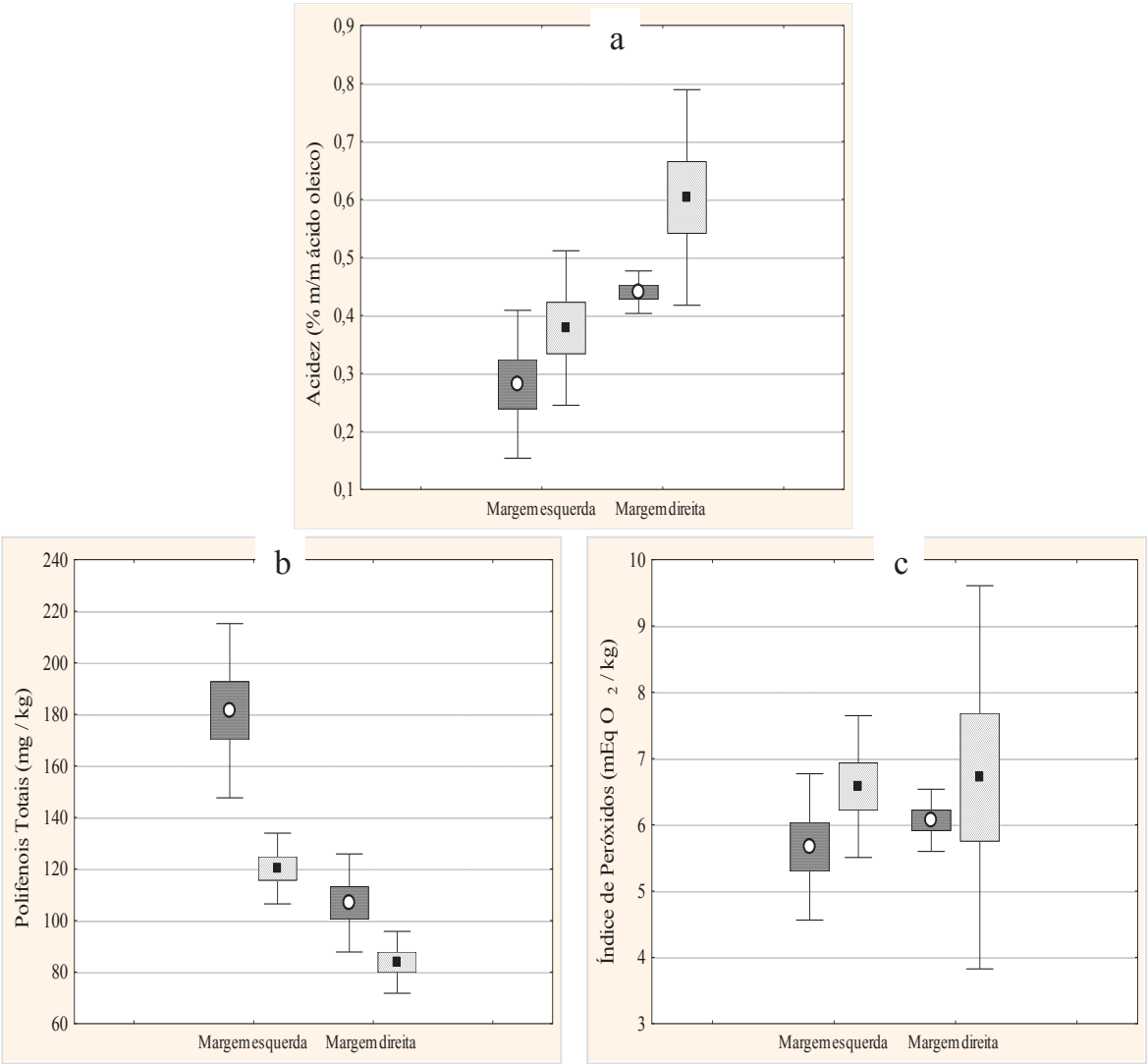


Figura 17 – Representação gráfica tipo "box and whisker" referente valores de % de acidez (a), de teor de polifenóis totais (b) e de índice de peróxidos (c) de azeites obtidos a partir de azeitona verde (o) e madura (■). Média: ponto central; erro padrão: box; desvio padrão: barras de erro.

Verifica-se que a percentagem de acidez na margem direita é superior à da margem esquerda independentemente do estado de maturação. Também se verifica que em ambas as margens do Rio Guadiana o teor de acidez aumentou com a maturação. O

aumento da percentagem de acidez é uma anomalia que resulta entre outras, do mau estado dos frutos, do mau processamento ou da má conservação do azeite, de acordo com Santos (2009). Estes resultados não revelam anomalias desta ordem pois temos valores de acidez reduzidos, sendo todas as amostras classificadas como virgem extra.

Quanto ao conteudo de polifenois totais verifica-se que no estado de maturação verde, em qualquer das margens, as amostras de azeite apresentam valores muito superiores aos azeites do estado de maturação maduro. Tambem se verifica que os teores de polifenois totais obtidos na margem esquerda são bastante superiores aos da margem direita, independentemente do estado de maturação.
Tal como Ramalheiro (2009) refere, a proporção de polifenóis diminui com o amadurecimento do fruto. Assim se verificou nestas amostras, em que todas as amostras obtidas de azeitonas maduras revelaram uma diminuição do teor de polifenóis totais em relação às amostras obtidas de azeitonas verdes. Também se verificam teores de polifenóis totais constantemente mais elevados nas amostras provenientes da margem esquerda do Rio Guadiana, independentemente do estado de maturação.

Uma vez que os polifenois têm função anti-oxidante esperava-se que os azeites obtidos de azeitonas no estado de maturação verde também tivessem valores inferiores de indice de peroxidos, pois têm um teor mais elevado de polifenois totais, e assim aconteceu nestas amostras como se pode verificar nos graficos da figura 17.
Os peróxidos são os produtos primários da oxidação do azeite. Os azeites são oxidados quando entram em contacto com o oxigénio que pode existir no espaço superior do recipiente e nele se dissolve. Os produtos de oxidação têm um sabor e odor desagradável e podem afetar negativamente o valor nutricional do azeite. Os ácidos gordos essenciais tais como ácido linoleico e linolénico são destruídos, e certas vitaminas solúveis são degradadas (Costa, 2012).
Tal como refere Santos (2009) também esta análise revela, quando existem, as alterações no azeite e, sendo o limite legal para o índice de peróxidos de 20 mEq O_2/kg verifica-se que todas as amostras apresentam um valor bastante inferior, sendo classificadas, também para este parâmetro, como azeite virgem extra.

Tendo em conta estes valores, verifica-se que as amostras ainda não sofreram qualquer processo de degradação oxidativa.

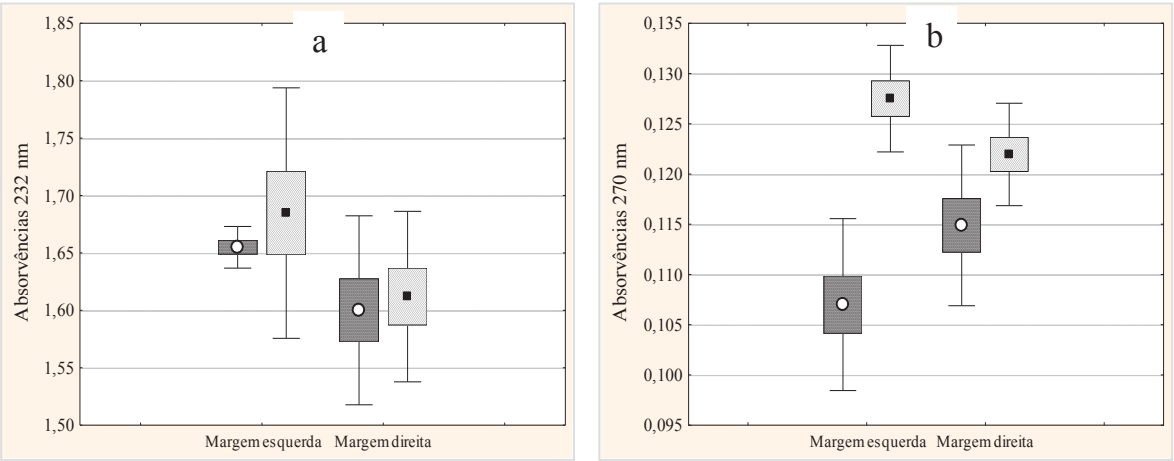


Figura 18 - Representação gráfica tipo "box and whisker" referente valores de % de absorvências a 232 nm (a) e de absorvências a 270 nm (b) de azeites obtidos a partir de azeitona verde (o) e madura (■). Média: ponto central; erro padrão: box; desvio padrão: barras de erro.

Tanto os resultados das absorvências a 232 como a 270 nm estão de acordo com os limites legais para azeites virgem extra, uma vez que estão inferiores a 2,5 e 0,22, respetivamente, como se pode verificar na figura 18 e no apêndice 1.

Os resultados da análise das absorvências (figura 18) revelam possíveis alterações oxidativas nos azeites, quando estas existem. Porém como já se tinha verificado anteriormente as amostras verdes têm: maior teor de polifenóis, menores valores de índice de peróxidos e também menores valores de absorvências, o que vem confirmar que os polifenóis protegem os azeites da degradação oxidativa.

Portanto também nos resultados obtidos nestas análises se volta a confirmar que não existem componentes oxidados nestes azeites.

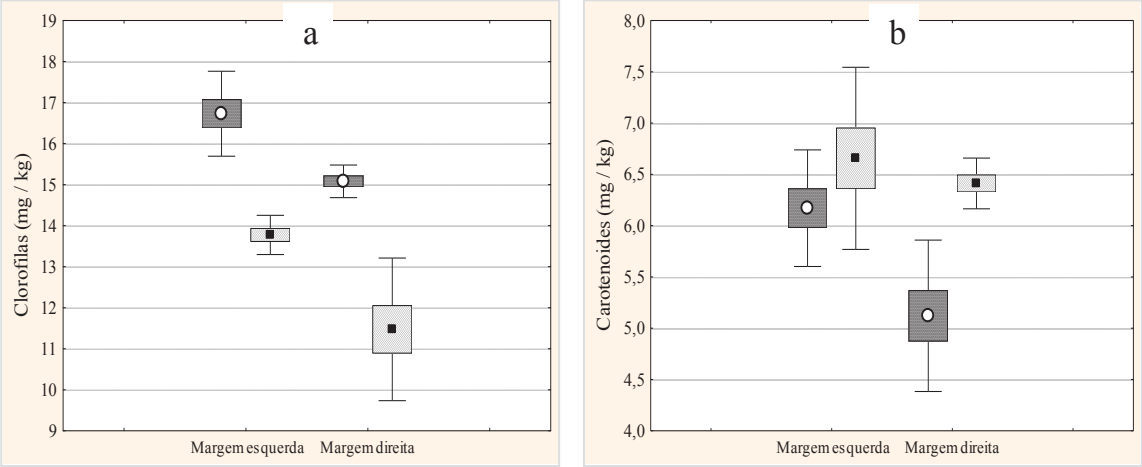


Figura 19 - Representação gráfica tipo "box and whisker" referente valores de teor de clorofilas (a) e de teor de carotenoides (b) de azeites obtidos a partir de azeitona verde (o) e madura (■). Média: ponto central; erro padrão: box; desvio padrão: barras de erro.

Pela observação da figura 19 confirma-se que, independentemente da margem, o teor de clorofilas presente é sempre superior nas amostras de azeite de maturação verde e diminui com o decorrer da maturação. Para o teor de carotenoides verifica-se o contrário.

Conceição *et al*, (2003), indica que as tonalidades esverdeadas do azeite estão associadas a maiores teores em clorofilas e as tonalidades alaranjadas aos carotenoides e indica também que as Clorofilas tendem a decrescer ao longo da maturação. O que seria de esperar pois com a evolução da maturação dá-se uma alteração da cor das azeitonas passando da cor verde para a cor preta, devido ao aumento das antocianas, portanto prevê-se que as azeitonas mais verde têm mais clorofilas que as maduras e que as azeitonas maduras têm mais carotenoides que as verdes. Tal como se verificou com as amostras em estudo neste projeto.

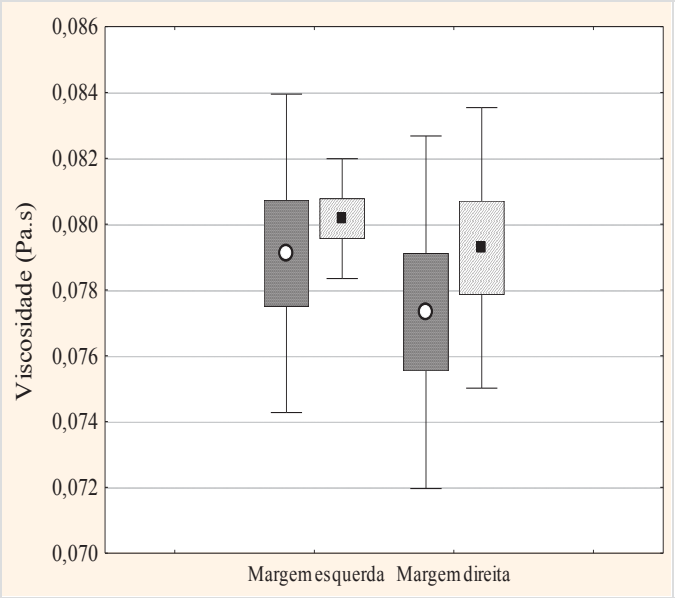


Figura 20 - Representação gráfica tipo "box and whisker" referente valores de viscosidade de azeites obtidos a partir de azeitona verde (o) e madura (■). Média: ponto central; erro padrão: box; desvio padrão: barras de erro.

Como indica Jones e Atkins, (1999), a viscosidade surge das forças entre as moléculas: forças intermoleculares fortes que mantêm as moléculas juntas e não as deixam mover-se com facilidade uma após a outra, ou seja, quanto maior a viscosidade de um líquido, mais lentamente ele flui. Pelos valores obtidos verifica-se que o azeite é um líquido pouco viscoso e que a maturação não tem interferência na viscosidade, pois todos os azeites tiverem uma viscosidade muito idêntica entre si (0,07 a 0,08 Pa.s), figura 20.

4.2.2) Análise de componentes principais

Para avaliar a evolução dos parâmetros físico-químicos das amostras ao longo da maturação foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP), a partir dos resultados de amostras em ambos os estados de maturação, referentes a 7 atributos, nomeadamente: polifenóis totais, índice de peróxidos, % de acidez, absorvências a 232 e 270 nm, pigmentos clorofilinos e carotenoides a 670 e 470 nm. Na tabela 4 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais.

Tabela 4 – Valores próprios e extração dos componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio Acumulado	Variância acumulada (%)
1	2,626275	37,51821	2,626275	37,5182
2	1,994231	28,48902	4,620506	66,0072
3	1,122742	16,03918	5,743248	82,0464
4	0,729518	10,42168	6,472766	92,4681
5	0,385036	5,50052	6,857803	97,9686
6	0,118128	1,68754	6,975930	99,6561
7	0,024070	0,34385	7,000000	100,0000

Os dois primeiros componentes principais explicaram 66 % da variância: 37,5 % para o primeiro componente e 28,5 % para o segundo. Só estes componentes foram significativos, uma vez que são os que apresentaram maior valor próprio. Estando em análise 7 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 7 atributos são transformados em 7 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por terem valor próprio superior a 1, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 2,6 e o segundo valor próprio 2,0.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 5).

Tabela 5 – Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Acidez	0,740307*	-0,383158
Polifenóis totais	-0,742013*	0,171189
Índice de Peróxidos	0,489672	0,253821
Absorvências 232 nm	0,046159	0,954028*
Absorvências 270 nm	0,774494*	0,348045
Clorofilas	-0,782291*	0,309821
Carotenoides	0,271860	0,791453*

* correlações significativas (r > 0,7).

Os resultados da análise mostraram que o 1º componente principal, CP1, é explicado, com maior peso, pelos polifenóis totais e pelas clorofilas (com valores de correlação negativos) e pela acidez e pelas absorvências a 270 nm (com valores de correlação positivos). O 2º componente principal, CP2, é explicado pelas absorvências a 232 nm e pelos carotenoides (com valor de correlação positivo). Assim, na figura 21 pode-se observar a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

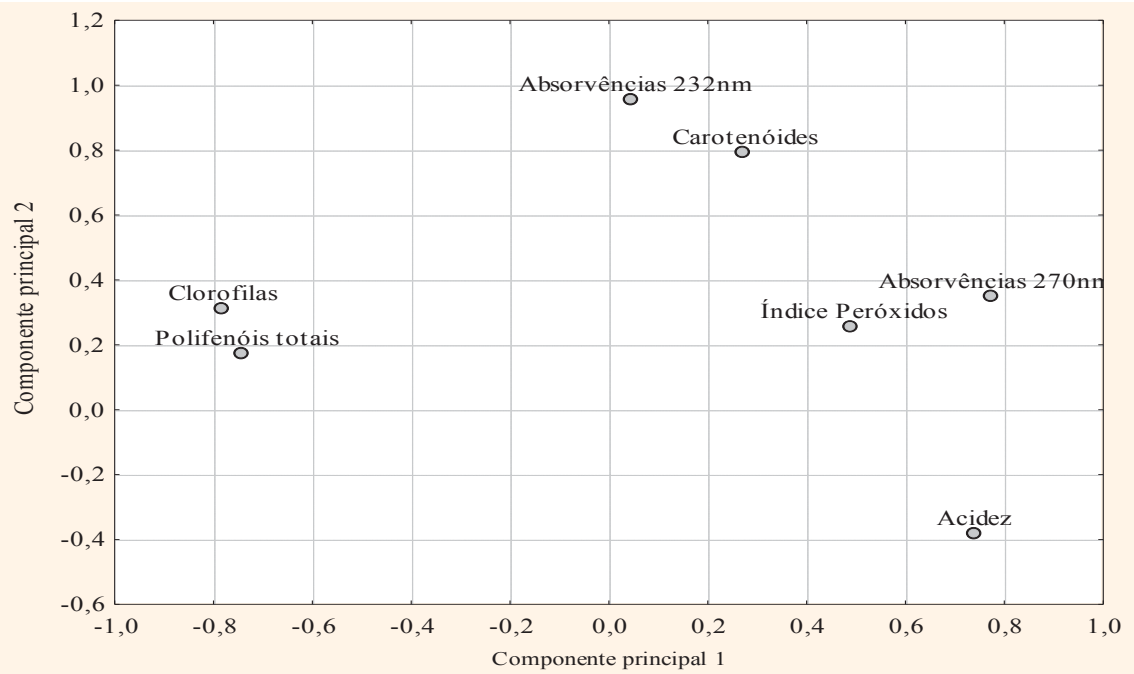


Figura 21 - Distribuição dos atributos no plano

E na figura 22 pode-se observar a projeção das amostras nos dois estados de maturação e nos dois locais no Plano principal.

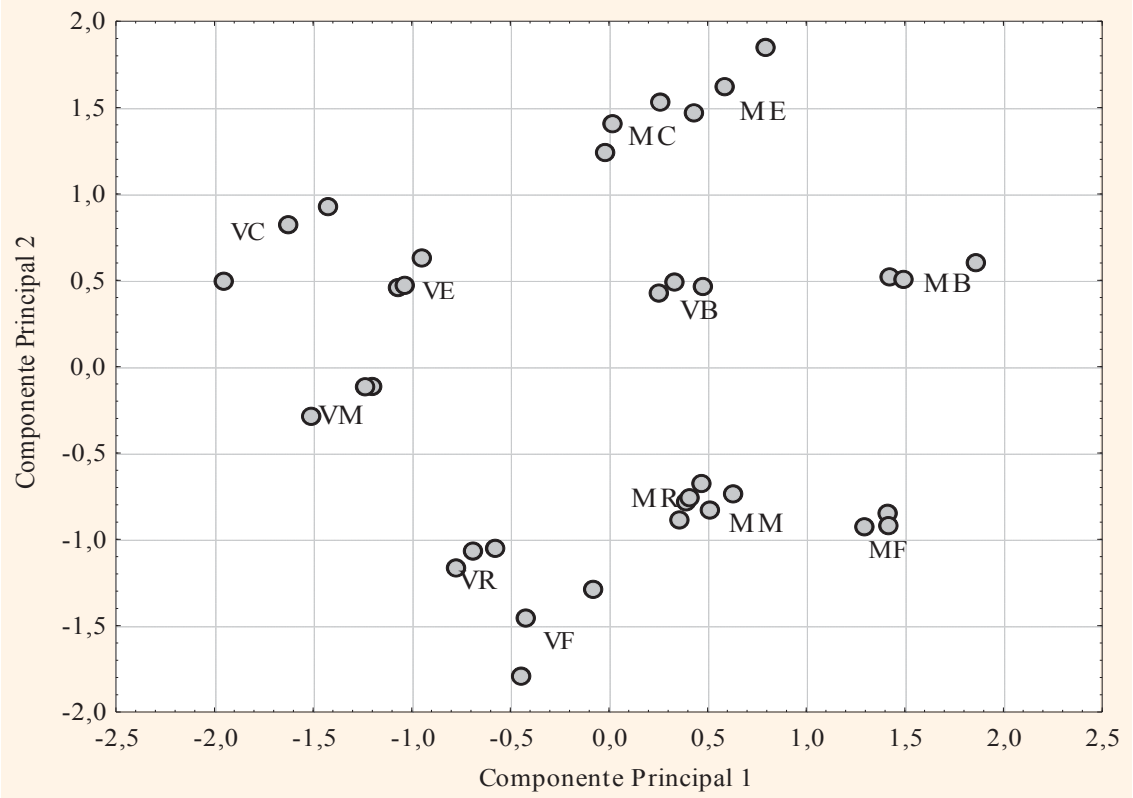


Figura 22 – Projeção das amostras nos dois estados de maturação e nos dois locais no plano principal

De acordo com as figuras 21 e 22, os maiores valores de pigmentos clorofilinos e polifenóis totais estão nas amostras verdes (VC, VE, VM) da margem esquerda do Rio Guadiana. As amostras com maiores valores de carotenoides são as maduras da margem esquerda (MC, ME).

A amostra com maior valor de absorvências a 270 nm e maior índice de peróxidos é a uma amostra madura da margem direita do Rio Guadiana (MB).

Portanto, também esta análise estatística vem confirmar todos os resultados já anteriormente referidos, vem reforçar que os pigmentos clorofilinos estão em maior quantidade nas amostras verdes da margem esquerda e logo também são estas que têm maiores valores de polifenóis totais.

4.3) Caracterização fenólica por HPLC

Para efetuar esta caracterização foi necessário validar, numa primeira fase, uma metodologia de HPLC adequada a este estudo. Com este objetivo prepararam-se padrões de compostos fenólicos individuais com concentrações conhecidas e construíram-se as respetivas curvas padrão para posterior identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras.

Numa segunda fase, analisaram-se todas as amostras de azeite com a metodologia validada. Os resultados da caracterização fenólica por HPLC apresentam-se a seguir, revelando a metodologia usada e os valores obtidos nos cromatogramas.

4.3.1) Metodologia validada

A extração fenólica para a análise HPLC foi realizada por uma extração liquido-liquido, seguindo o método utilizado na Faculdade de Ciências Experimentais da Universidade de Huelva, adaptado para as condições de análise e para a coluna usada no presente ensaio.

Após otimização do método base, referido anteriormente, procedeu-se à análise em 2 etapas: a primeira de preparação da amostra e a segunda na análise propriamente dita.

1) **Preparação da amostra**:

Efetuada como descrito no ponto 3.2 deste relatório.

2) **Análise**:

Preparar uma tabela de análise com a identificação das várias amostras, para o injetor automático retirar a amostra e analisá-la.

A análise foi efetuada de acordo com as condições descritas em seguida:

⇒ Condições analíticas:

Bomba – Marca: Merck Hitachi LaChrom; Modelo: L-7100;

Detetor – Marca: Merck Hitachi LaChrom; Modelo: UV-VIS L-7420;

Coluna HPLC – Marca: Lichrocart; Modelo: 250-4 Purospher STAR;

Volume injetado: 100µL;

Solvente A: 5% de Metanol, 2% de ácido acético glacial, e restante de água ultra pura;

Solvente B: 81,3% de Metanol, 1,7% de ácido acético glacial, e restante de água ultra pura;

Comprimento de onda: 280 nm;

Temperatura da coluna: 25ºC.

O equipamento utilizado cujas características foram descritas anteriormente está representado na figura 23 e na figura 24 observa-se o suporte para os viais com os viais utilizados neste equipamento.

Figura 23 – Equipamento de HPLC utilizado nas análises
Fonte: Freitas, 2013

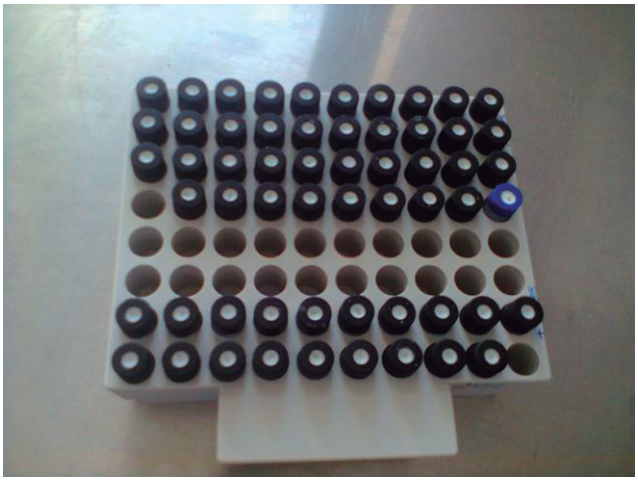


Figura 24 – Suporte e viais com as amostras analisadas no HPLC
Fonte: Freitas, 2013

Os volumes de solvente foram usados em gradiente de acordo com o descrito na tabela 6.

Tabela 6 – Gradiente de solventes utilizados na análise de HPLC validada

Tempo (minutos):	Solvente A (%):	Solvente B (%):	Fluxo (ml / min):
0,0	100	0	1,0
5,0	100	0	
25,0	60	40	
50,0	25	75	
70,0	0	100	
90,0	100	0	
100,0	100	0	

4.3.2) Resultados obtidos nas curvas dos padrões para a analise de HPLC

Prepararam-se os padrões (ácido gálico, hidroxitirosol, ácido cafeico, oleuropeína) com concentrações diferentes para se construírem as retas de calibração necessárias à quantificação destes compostos nas amostras de azeite.

Nas figuras 25 a 28 estão representadas as retas obtidas por regressão linear de todos os padrões utilizados para a análise de HPLC.

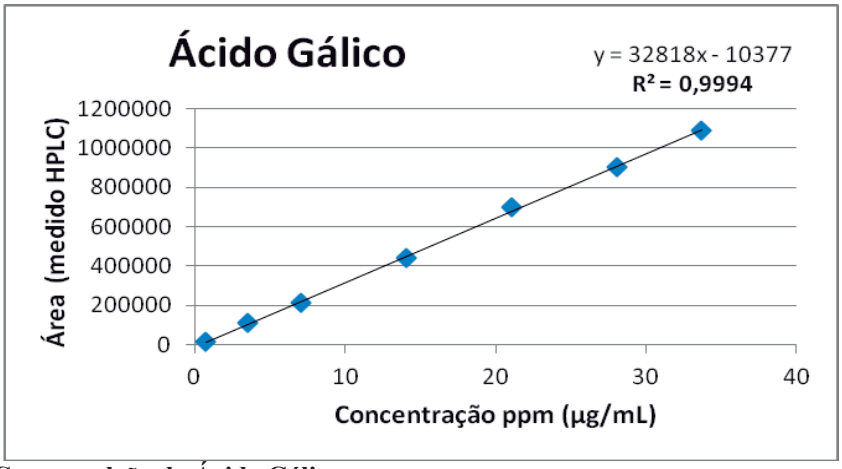


Figura 25 – Curva padrão do Ácido Gálico

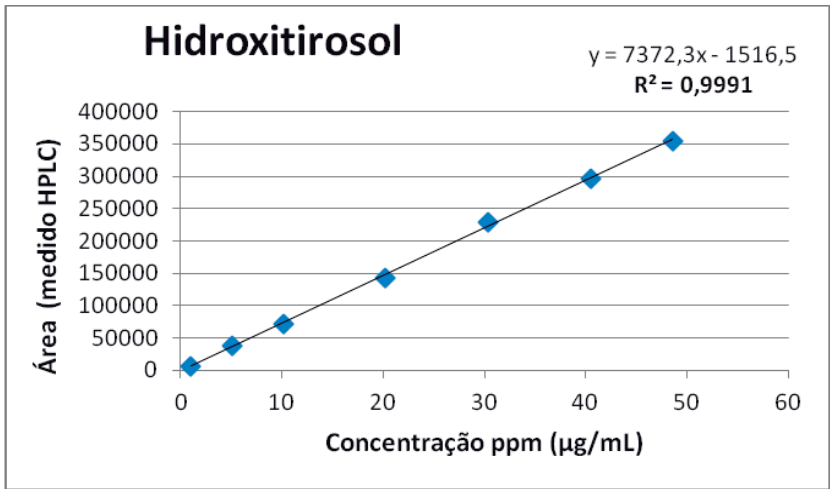


Figura 26 – Curva padrão do Hidroxitirosol

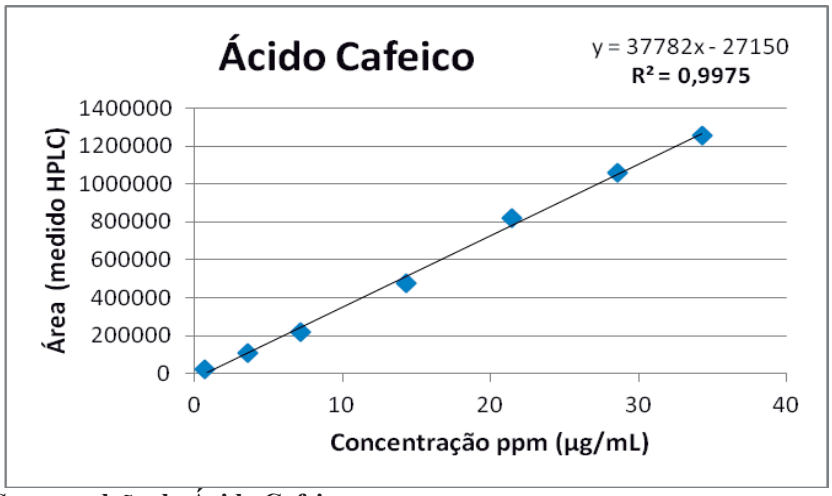


Figura 27 – Curva padrão do Ácido Cafeico

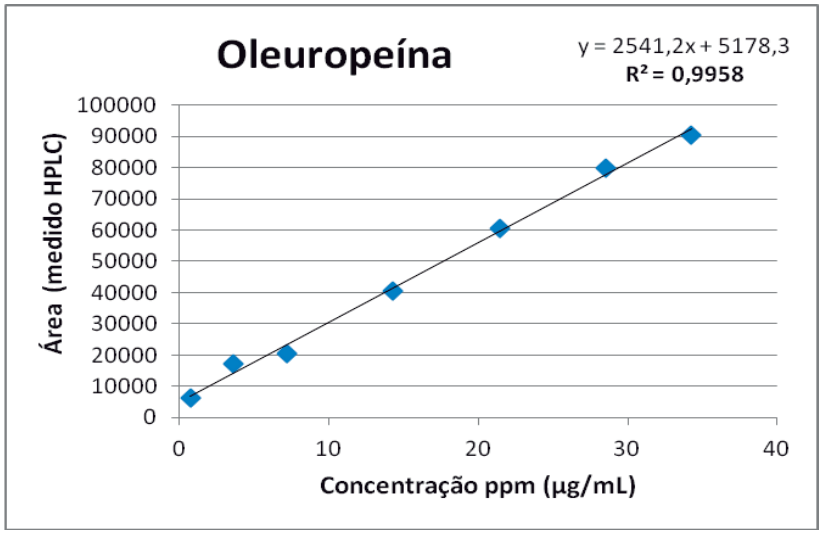


Figura 28 – Curva padrão da Oleuropeína

Em todas as rectas se verifica um valor de R^2 muito proximo 1, como é pretendido.

4.3.3) Resultados obtidos na análise cromatográfica – HPLC

A tabela 7 apresenta as concentrações dos polifenóis analisados nas várias amostras.

Tabela 7 – Resultados obtidos na análise de HPLC

Amostras:			**Polifenóis** (mg / kg azeite)**:**			
			Ácido Gálico	*Hidroxitirosol*	*Ácido Cafeico*	*Oleuropeína*
Margem Esquerda	***Verde***	VM 1	n.d.	11,61	0,89	28,92
		VM 2	n.d.	14,02	0,95	35,95
		VM 3	n.d.	9,55	0,86	21,50
	Maduro	MM 1	n.d.	7,35	0,79	6,21
		MM 2	n.d.	8,13	0,79	8,90
		MM 3	n.d.	6,61	0,77	5,57
	Verde	VC 1	n.d.	2,77	1,23	87,85
		VC 2	n.d.	1,73	1,14	86,18
		VC 3	n.d.	4,36	1,23	89,77
	Maduro	MC 1	n.d.	2,23	0,00	42,48
		MC 2	n.d.	2,72	0,00	42,96
		MC 3	n.d.	3,03	0,98	44,91
	Verde	VE 1	n.d.	19,02	0,00	44,50
		VE 2	n.d.	29,38	0,00	30,66
		VE 3	n.d.	29,96	0,00	27,05
	Maduro	ME 1	n.d.	6,76	0,00	28,10
		ME 2	n.d.	5,21	0,00	28,55
		ME 3	n.d.	6,25	0,00	31,39
Margem Direita	***Verde***	VF 1	n.d.	4,76	0,88	31,08
		VF 2	n.d.	5,08	0,88	31,87
		VF 3	n.d.	5,48	0,91	34,50
	Maduro	MF 1	n.d.	3,77	0,81	23,06
		MF 2	n.d.	3,82	0,81	23,33
		MF 3	n.d.	4,14	0,83	26,71
	Verde	VR 1	n.d.	1,31	1,29	25,52
		VR 2	n.d.	1,49	0,86	25,72
		VR 3	n.d.	1,28	1,15	21,23
	Maduro	MR 1	n.d.	1,15	0,80	23,52
		MR 2	n.d.	1,03	0,74	17,19
		MR 3	n.d.	1,04	0,79	19,45
	Verde	VB1	n.d.	3,79	0,77	26,05
		VB2	n.d.	5,78	0,76	27,04
		VB3	n.d.	6,06	0,88	36,51
	Maduro	MB1	n.d.	4,21	0,91	12,90
		MB2	n.d.	4,89	0,93	14,99
		MB3	n.d.	3,33	0,90	6,90

Novamente esta análise vem mostrar que o teor dos vários compostos fenólicos analisados é superior nas amostras de maturação verde face às amostras de maturação madura; e também é superior na margem esquerda do Rio Guadiana face à margem direita.

Em relação aos compostos fenólicos analisados é bastante visível que a oleuropeína e derivados tem maior representatividade nestas amostras, seguindo-se o hidroxitirosol e, por fim, o ácido cafeico que não está representado em algumas da amostras. O ácido gálico não foi detetado em nenhuma das amostras em estudo.

Tal como já tinha sido referido anteriormente por Omar (2010), Costa (2012) e Romero *et al.* (2002) a oleuropeína é o principal composto fenólico nas azeitona e decresce com a evolução da maturação, tal como se observa nos resultados obtidos nestes azeites.

CAPITULO V – CONCLUSÃO

Os três principais objetivos deste trabalho foram:

a) A caracterização química de amostras de azeite virgem provenientes de azeitonas da cultivar galega vulgar em dois estados de maturação, oriundas de lagares localizados nas duas margens do rio Guadiana para verificação das possíveis diferenças nos azeites obtidos, principalmente em relação ao conteúdo em polifenóis.
b) validação de um método por HPLC para identificação e quantificação de compostos fenólicos existentes nas amostras.
c) caracterização fenólica dos azeites virgens em análise.

Após a classificação de todas as amostras como azeite virgem extra e a análise estatística dos resultados obtidos (ACP) conseguiu-se demonstrar que existem diferenças na composição química dos azeites, apesar de terem sido obtidos de azeitonas com idêntico estado de maturação, colhidas em olivais tradicionais extraídas pelo mesmo método de extração. Esta diferença foi mais acentuada em relação ao conteúdo em polifenóis totais e também em relação aos pigmentos clorofilinos, permitindo separar perfeitamente os azeites extraídos de azeitonas verdes da cultivar galega vulgar, colhidas em olivais situados na margem esquerda do rio Guadiana.

Conclui-se, assim, que as diferenças observadas se devem provavelmente a diferenças nas características edafoclimáticas de ambas as regiões, principalmente em relação ao solo. Assim, como referido anteriormente por vários autores neste trabalho, estas características influenciam a composição final de um azeite.

De acordo com as cartas de solo, apresentadas no anexo 2 existem diferenças na composição dos solos das duas margens, onde se situam os olivais. Na margem direita do rio Guadiana os solos são maioritariamente solos mediterrâneos pardos e solos calcários e na margem esquerda predominam os solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos. No futuro deverá continuar-se a estudar esta linha para comprovar os resultados preliminares obtidos neste trabalho.

Outro parâmetro que também poderá ter influência é a altitude, uma vez que os concelhos situados na margem esquerda do rio (Moura e Serpa) apresentam uma

altitude máxima bastante mais elevada do que os concelhos da margem direita do rio Guadiana, como se verifica no ponto 3.1 do anexo 3, ainda que todas as altitudes se encontrem dentro dos valores referidos pelos vários autores anteriormente citados.
Em relação ao clima (temperatura e precipitação) também estes se encontram de acordo com os valores limites, e não se verificaram diferenças substanciais entre os concelhos em análise (pontos 3.2 e 3.3 do anexo 3), pelo que não deverão ter sido estes os fatores determinantes nas diferenças obtidas na composição dos azeites virgens em análise.

Após validação do método por HPLC, que permitiu a caracterização fenólica das amostras verificou-se que também, neste caso, a concentração dos compostos fenólicos em análise foi superior nas amostras de azeite obtidas de azeitonas no estado de maturação verde face às obtidas de azeitonas maduras, em especial nos azeites da margem esquerda do rio Guadiana. O composto fenólico com maior representatividade foi a oleuropeína e derivados, seguida do hidroxitirosol (como se comprova na tabela 7 e no anexo 1).

Uma vez que o presente estudo incidiu apenas em amostras de azeite virgem obtidas na campanha 2012/2013, sugere-se a continuação do trabalho nas próximas campanhas e com outras cultivares tradicionais da região do Alentejo para confirmação dos resultados obtidos.

Sugere-se ainda, a par da caracterização química dos azeites monovarietais provenientes das duas margens do rio Guadiana, a caracterização sensorial dos mesmos com vista à elaboração de um catálogo regional de cultivares tradicionais e respetiva caracterização dos azeites virgens extra monovarietais locais.

No seguimento do que se verifica atualmente em Itália, o desenvolvimento do conhecimento das características dos azeites virgem extra monovarietais obtidos de cultivares tradicionais portuguesas levará ao melhor conhecimento das regiões originárias desses azeites, o que será uma mais-valia para o turismo nacional, um setor crucial na economia do país.

CAPITULO VI – BIBLIOGRAFIA

Agbiolab, Inc., (2009). *Polyphenols and Antioxidants in Olive Oil.* Acedido em: 27 de Março de 2013, em: http://www.mammamiausa.com/MammaMiaUSAEVOO-PressKit.pdf

Alvarenga, N. (2008). *Introdução da tecnologia de congelação na produção de queijo de ovelha.* Tese de doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 164pp

Barranco, D., Fernandez-Escobar, R. e Rallo, L. (2001). *El cultivo del olivo*. 4ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Batista, J. (2003). *Comportamento tecnológico de duas variedades de oliveira de acordo com diferentes épocas de colheita*. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja, Beja. 63pp

Baer, I. (2006). *Contribuição para o estudo da degradação oxidativa de azeites virgens provenientes das cultivares Cordovil de Serpa, Galega vulgar e Verdeal alentejana.* Tese de mestrado em Olivicultura, Azeite e Azeitona de mesa. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 134pp

Baer, I. (2010). *Apontamentos teóricos das aulas de Tecnologia de Azeites e óleos Vegetais.* Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja, Beja.

Bubola, K., Koprivnjak, O. e Sladonja, B. (2012). Influence of filtration on volatile compounds and sensory profile of virgin olive oils. *Food Chemistry.* **132:** 98-103.

Casa do azeite - Associação do Azeite de Portugal – Apreciadores (2013). Acedido em 15 de Março de 2013, em: http://www.casadoazeite.pt/

CEPAAL – Centro de Estudos e Promoção do Azeite do Alentejo (2013). *Região e Fileira.* Acedido em 25 de Março de 2013, em: http://www.azeitesdoalentejo.com/

Clark, J. (2007). *High performance liquid chromatography – HPLC.* Acedido em 15 de Março de 2013, em: http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html

Conceição, A., Gouveia, C., Vitorino, M., Henriques, L. e Peres, M. (2003). *Azeite 'Galega Vulgar': evolução sensorial durante a maturação na campanha 2000/01- III Simpósio Nacional de Olivicultura.* Acedido em Fevereiro de 2013, no web site do Repositório Cientifico do IPCB (Instituto Politécnico de Castelo Branco): http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/265/1/APH7.pdf

Costa, B. (1992). *Contribuição para a definição da zona de produção homogenea de azeite de Moura pelo estudo dos solos, clima e variedades de oliveira de algumas freguesias daquele concelho.* Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja, Beja. 105pp

Costa, H. (2012). *AZEITES AROMATIZADOS: Estudo da Influência do Agente Aromatizante na Composição Química e Resistência à Oxidação.* Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Bragança, Bragança. 60pp

Fernandes, S., Peres, M. e Henriques, L. (2001). *Aspectos da qualidade de azeites monovarietais da Beira Baixa para quatro estados de maturação dos frutos, campanha 1998/99 - II Simpósio Nacional de Olivicultura.* Acedido em 25 Fevereiro de 2013, no web site do Repositório Cientifico do IPCB (Instituto Politécnico de Castelo Branco): http://repositorio.ipcb.pt/handle/10400.11/1100

Ferguson, L., Sibbett, G. e Martin, G. (1994). *Olive production manual*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland, California.

Fundação Eugénio de Almeida (2012). *Olival.* Acedido em: 10 de Abril de 2013, em: http://fundacaoeugeniodealmeida.pt/cartuxa/categoriaOnClick.aspx?ID=13&lingua=pt

Guerrero, A. (2003). *Nueva olivicultura*. 5ª edicion. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Gouveia, C., Peres, M., Vitorino, M., Henriques, L. e Pinheiro-Alves, M. (2003). *Polifenóis e tocoferóis em azeites monovarietais - III Simpósio Nacional de Olivicultura.* Acedido em Março de 2013, no web site do Repositório Cientifico do IPCB (Instituto Politécnico de Castelo Branco): http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/263/1/APH5.pdf

Hatzakis, E., (2012). *Important Minor Compounds in Olive Oil.* Acedido em 5 de Fevereiro de 2013, em: http://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-health-news/important-minor-compounds-in-olive-oil/30796

Henriques, L., Peres, M., Vitorino, M., Pinheiro-Alves, M. e Simões, M. (2001). *Estabilidade relativamente à oxidação de azeites monovarietais da Beira Baixa.* Acedido em Março de 2013, no web site do Repositório Cientifico do IPCB (Instituto Politécnico de Castelo Branco): http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/1102/1/Estabilidade%20relativamente%20a%20oxida%C3%A7%C3%A3o.pdf

Herdade do Esporão, (2013) - *Regiões produtoras de Azeite em Portugal.* Acedido em: 10 de Abril de 2013, em: http://www.esporaoazeites.com/pt/regioes-produtoras/

Jones, L. e Atkins, P. (1999). *Chemistry: molecules, matter, and change*. 4ª edição, V. H. Freeman and Company. New York.

MAMAOT/GPP - Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território / Gabinete de Planeamento e Politicas. (2011). *Anuário Agrícola 2011 - informação de mercados.* MAMAOT/GPP. Lisboa.

MADRP/GPP - Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas / Gabinete de Planeamento e Politicas. (2007). *OLIVICULTURA - Diagnóstico Sectorial 2007*. MADRP/GPP. Lisboa.

MADRP/GPP - Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas / Gabinete de Planeamento e Politicas. (2011). *Azeitona Laborada e Azeite Extraído pelos Lagares / por região campanha 2010/11.* MADRP/GPP. Lisboa.

MAMAOT/GPP - Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território / Gabinete de Planeamento e Politicas. (2012). *Azeitona Laborada e Azeite Extraído pelos Lagares / por região campanha 2011/12*. MAMAOT/GPP. Lisboa.

Marini, F., D'Aloise, A., Bucci, R., Buiarelli, F., Magrì, A., e Magrì, A. (2011). Fast analysis of 4 phenolic acids in olive oil by HPLC-DAD and chemometrics. *Journal El Servier - Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* **106:** 142-149

Matos, L., Pereira, J., Andrade, P., Seabra, R. e Oliveira, M. (2001). Correlação entre o teor de polifenóis e a resistência à oxidação de azeites varietais obtidos de azeitonas com diferentes índices de maturação e pertencentes às cultivares Cobrançosa, Madural e Verdeal transmontana. Em: *Analítica 2001 - 3º Encontro Nacional de Química Analítica*. Lisboa 8 e 9 Novembro de 2001, ISEL, Lisboa. 13.

Minguez-Mosquera, M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A. e Garrido-Fernandez, J. (1991). Color-Pigment Correlation in Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* ***68**: 332-336*

Moreaux, S. (2002). *A Oliveira*. 1ª edição, Temas & Debates – Actividades Editorias Lda. Lisboa

Neves, H (1980). *Introdução à prática da cromatografia gás-liquido*. 1ª edição, Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de ciências e tecnologia. Lisboa.

Omar, S. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Sci Pharm.* **78**: 133–154

Pansiot, F. e Rebour, H. (1961). *Mejoramiento del cultivo del olivo*. FAO: Estudios agropecuarios n.º 50. Organizacion de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentacion. Roma.

Papadopoulos, G. e Boskou, D. (1991). Antioxidant Effect of Natural Phenols on Olive Oil. *JAOCS.* **Vol. 68, n.º 9**: 669-671.

Paquete, M. (2009). *O azeite na cultura e no património alimentar*. 1ª edição. Colares Editora. Sintra.

Peres, F., Ferreira, A., Pintado, C., Henriques, L., Coutinho, J., Luz, J., Vitorino, C., Gouveia, C., Amaro, C., Outão, F., Fragoso, P., Peres, c., Antunes, V., Domingos, A. e Pereira, J. (2006). Olivicultura sustentável e qualidade do azeite "galega" na Beira Baixa. *Melhoramento*, **41**: 199-203

Perez-Trujillo, M., Gómez-Caravaca, A., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. e Parella, T. (2010). Separation and Identification of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil from Olea europaea L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a New Diastereoisomer of the Aldehydic Form of Oleuropein Aglycone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 9129–9136

Phytochemicals, (2013) – *Gallic Acid.* Acedido em: 10 de Abril de 2013, em: http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/gallic-acid.php

Piçarra, F. (2002). *A influência do período de colheita das azeitonas Galega vulgar, Cordovil de Serpa e Verdeal alentejana, na rentabilização do processamento do azeite*. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja, Beja. 52pp

Pordata – Base de Dados Portugal Contemporâneo, (2013). Acedido em: 10 de Abril de 2013, em: http://www.pordata.pt/

Portal do azeite (2012) – *A produção de azeite cresceu 44% em 2011, face à média dos três anos anteriores e as exportações aumentaram 67%.* Acedido em: 25 de Março de 2013, em: http://www.portaldoazeite.com/2012/11/a-producao-de-azeite-cresceu-44-em-2011.html

Porto editora, (1998). Mapa escolar de Portugal. Lisboa.

Qualifica - Associação Nacional de Municípios e de Produtores para a Valorização e Qualificação dos Produtos Tradicionais Portugueses, (2009). *Produtos Qualificados*.

Acedido em: 15 de Abril de 2013, em: http://www.qualifica.pt/index.php?go=scroll&pagina=produtos&tipo=0

Ramalheiro, J. (2009). *Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades.* Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 41pp

Regulamento UE n.º 61/2011 de 24 de Janeiro, anexo I. *Jornal Oficial da União Europeia L 23*. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento CE nº 708/2005 de 10 de Maio, anexo II. *Jornal Oficial da União Europeia L 119*. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento CE nº 1513/2001 de 23 de Julho. *Jornal Oficial da União Europeia L 201*. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento CEE nº 2568 /91 de 11 de Julho, anexo II. *Jornal Oficial da União Europeia L 248*. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento CEE nº 2568 /91 de 11 de Julho, anexo III. *Jornal Oficial da União Europeia L 248*. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento CEE nº 2568 /91 de 11 de Julho, anexo IX. *Jornal Oficial da União Europeia L 248*. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Romero, C., Brenes, M., García, P. e Garrido, A. (2002). Hydroxytyrosol 4-β-D-Glucoside, an Important Phenolic Compound in Olive Fruits and Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 3835-3839.

Santos, M. (2009). *A influência da utilização de gás inerte na estabilidade oxidativa dos azeites virgens nos depósitos de armazenamento*. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar – Tecnologia dos Produtos Vegetais. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 57pp

Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R. e Montedoro, G. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology. **17**: 76–84*

Simões-Lopes, P., Gouveia, J., Peres, M., Gouveia, C., Henriques, L., Pinheiro-Alves, M. e Freitas, A. (2006). Qualidade dos azeites virgens portugueses com Denominação de Origem Protegida (DOP). *Melhoramento*, **41**: 210-216

Sousa, A., Duarte, A., Nunes, A. E Góis P. (2012). *A equipa HT team desenvolveu olidrox, um anti-oxidante natural produzido a partir dos resíduos da produção de azeite.* Acedido em: 10 de Abril de 2013, em: https://www.actbycotec.com/pt/portfolio.78/projectos.114/cohitec.125/ht.a132.html

SROA - Serviço de Reconhecimento e de Ordenamento Agrário (1966) – Carta de solos de Portugal, n.ºs: 40 B, 43 B, 43 C, 43 D. Papelaria Fernandes. Lisboa.

Vaz-Freire, L., Gouveia, J. e Freitas, A. (2008). Analytical characteristics of olive oils produced by two different extraction techniques, in the Portuguese olive variety "Galega Vulgar". *Grasas y aceites. **59 (3):** 260-266.*

Vicente, C. (1840). *Arte de cultivar el olivo*. Colección Mediocelemín. Editorial El Olivo. Úbeda.

Vital, A. (2002). *Validação de um método para determinação de ácido benzoico e sórbico em concentrados de fruta por HPLC*. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja, Beja. 39pp

APÊNDICES e ANEXOS

Apêndice 1 – Neste apêndice são apresentadas as tabelas 8 e 23 que mostram os resultados médios obtidos nas réplicas das análises das amostras verdes e maduras em ambas as margens do Rio Guadiana.

Tabela 8 – Resultados médios obtidos na análise da % de acidez nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	VM2	VM3	VC1	VC2	VC3	VE1	VE2	VE3
% Acidez (expresso em % ácido oleico)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,4
	MM1	MM2	MM3	MC1	MC2	MC3	ME1	ME2	ME3
	0,6	0,6	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Tabela 9 – Resultados médios obtidos na análise da % de acidez nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	VF2	VF3	VR1	VR2	VR3	VB1	VB2	VB3
% Acidez (expresso em % ácido oleico)	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	MF1	MF2	MF3	MR1	MR2	MR3	MB1	MB2	MB3
	0,7	0,7	0,7	0,4	0,4	0,3	0,7	0,7	0,7

Tabela 10 – Resultados médios obtidos na análise ao índice de peróxidos nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	VM2	VM3	VC1	VC2	VC3	VE1	VE2	VE3
Índ. Peróxidos (expresso em mEq O_2 / kg)	7	6	6	4	4	4	6	6	6
	MM1	MM2	MM3	MC1	MC2	MC3	ME1	ME2	ME3
	6	6	7	5	5	7	8	7	6

Tabela 11 – Resultados médios obtidos na análise ao índice de peróxidos nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	VF2	VF3	VR1	VR2	VR3	VB1	VB2	VB3
Índ. Peróxidos (expresso em mEq O_2 / kg)	5	5	6	6	6	6	7	6	6
	MF1	MF2	MF3	MR1	MR2	MR3	MB1	MB2	MB3
	6	5	5	4	4	5	9	11	11

Tabela 12 – Resultados médios obtidos na análise ao teor de Polifenóis Totais nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	**VM2**	**VM3**	**VC1**	**VC2**	**VC3**	**VE1**	**VE2**	**VE3**
Polifenóis Totais (expresso em mg / kg azeite)	142,4	150,1	132,5	182,2	181,3	187,8	217,4	219,4	219,6
	MM1	**MM2**	**MM3**	**MC1**	**MC2**	**MC3**	**ME1**	**ME2**	**ME3**
	134,8	145,9	129,1	113,9	115,9	119,1	111,1	105,2	106,5

Tabela 13 – Resultados médios obtidos na análise ao teor de Polifenóis Totais nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	**VF2**	**VF3**	**VR1**	**VR2**	**VR3**	**VB1**	**VB2**	**VB3**
Polifenóis Totais (expresso em mg / kg azeite)	101,5	104,8	104,9	129,0	132,8	128,4	84,0	87,7	88,5
	MF1	**MF2**	**MF3**	**MR1**	**MR2**	**MR3**	**MB1**	**MB2**	**MB3**
	99,0	99,5	100,3	74,5	72,8	74,1	77,7	79,1	77,5

Tabela 14 – Resultados médios obtidos na análise ao teor de clorofila nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	**VM2**	**VM3**	**VC1**	**VC2**	**VC3**	**VE1**	**VE2**	**VE3**
Clorofila (expresso em mg / kg azeite)	15,630	15,702	15,660	17,979	17,997	18,034	16,836	16,387	16,330
	MM1	**MM2**	**MM3**	**MC1**	**MC2**	**MC3**	**ME1**	**ME2**	**ME3**
	13,124	13,124	13,206	13,907	14,087	14,291	14,044	14,134	14,044

Tabela 15 – Resultados médios obtidos na análise ao teor de clorofila nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	**VF2**	**VF3**	**VR1**	**VR2**	**VR3**	**VB1**	**VB2**	**VB3**
Clorofila (expresso em mg / kg azeite)	15,481	15,408	15,057	15,131	15,212	15,131	15,400	14,658	14,250
	MF1	**MF2**	**MF3**	**MR1**	**MR2**	**MR3**	**MB1**	**MB2**	**MB3**
	10,139	10,245	9,902	10,571	10,693	10,440	13,932	14,038	13,296

Tabela 16 – Resultados médios obtidos na análise ao teor de carotenoides nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	**VM2**	**VM3**	**VC1**	**VC2**	**VC3**	**VE1**	**VE2**	**VE3**
Carotenoides (expresso em mg / kg azeite)	5,470	5,428	5,408	6,345	6,398	6,405	6,705	6,703	6,676
	MM1	**MM2**	**MM3**	**MC1**	**MC2**	**MC3**	**ME1**	**ME2**	**ME3**
	5,505	5,488	5,515	7,475	7,450	7,440	7,108	6,983	6,945

Tabela 17 – Resultados médios obtidos na análise ao teor de carotenoides nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	**VF2**	**VF3**	**VR1**	**VR2**	**VR3**	**VB1**	**VB2**	**VB3**
Carotenoides (expresso em mg / kg azeite)	4,390	4,393	4,338	4,945	4,978	4,915	6,120	6,103	5,910
	MF1	**MF2**	**MF3**	**MR1**	**MR2**	**MR3**	**MB1**	**MB2**	**MB3**
	6,735	6,690	6,583	6,165	6,175	6,165	6,645	6,340	6,208

Tabela 18 – Resultados médios obtidos na análise das absorvências a 232 nm nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	**VM2**	**VM3**	**VC1**	**VC2**	**VC3**	**VE1**	**VE2**	**VE3**
Absorvências 232 nm	1,65	1,64	1,66	1,66	1,69	1,68	1,65	1,64	1,64
	MM1	**MM2**	**MM3**	**MC1**	**MC2**	**MC3**	**ME1**	**ME2**	**ME3**
	1,55	1,54	1,54	1,73	1,74	1,74	1,78	1,78	1,77

Tabela 19 – Resultados médios obtidos na análise das absorvências a 232 nm nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	**VF2**	**VF3**	**VR1**	**VR2**	**VR3**	**VB1**	**VB2**	**VB3**
Absorvências 232 nm	1,55	1,50	1,56	1,56	1,55	1,56	1,69	1,71	1,72
	MF1	**MF2**	**MF3**	**MR1**	**MR2**	**MR3**	**MB1**	**MB2**	**MB3**
	1,54	1,54	1,55	1,58	1,59	1,59	1,70	1,70	1,72

Tabela 20 – Resultados médios obtidos na análise das absorvências a 270 nm nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	**VM2**	**VM3**	**VC1**	**VC2**	**VC3**	**VE1**	**VE2**	**VE3**
Absorvências 270 nm	0,10	0,09	0,10	0,11	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11
	MM1	**MM2**	**MM3**	**MC1**	**MC2**	**MC3**	**ME1**	**ME2**	**ME3**
	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,14	0,14	0,13

Tabela 21 – Resultados médios obtidos na análise das absorvências a 270 nm nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	**VF2**	**VF3**	**VR1**	**VR2**	**VR3**	**VB1**	**VB2**	**VB3**
Absorvências 270 nm	0,11	0,11	0,12	0,11	0,10	0,11	0,12	0,12	0,13
	MF1	**MF2**	**MF3**	**MR1**	**MR2**	**MR3**	**MB1**	**MB2**	**MB3**
	0,13	0,12	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13

Tabela 22 – Resultados médios obtidos na análise da viscosidade nas amostras da Margem Esquerda do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Esquerda***								
	VM1	**VM2**	**VM3**	**VC1**	**VC2**	**VC3**	**VE1**	**VE2**	**VE3**
Viscosidade (Expresso em Pa.s)	0,079	0,079	0,082	0,067	0,079	0,082	0,078	0,083	0,083
	MM1	**MM2**	**MM3**	**MC1**	**MC2**	**MC3**	**ME1**	**ME2**	**ME3**
	0,078	0,081	0,080	0,077	0,081	0,082	0,079	0,082	0,082

Tabela 23 – Resultados médios obtidos na análise da viscosidade nas amostras da Margem Direita do Rio Guadiana

Análise:	***Margem Direita***								
	VF1	**VF2**	**VF3**	**VR1**	**VR2**	**VR3**	**VB1**	**VB2**	**VB3**
Viscosidade (Expresso em Pa.s)	0,068	0,076	0,080	0,069	0,079	0,080	0,080	0,082	0,082
	MF1	**MF2**	**MF3**	**MR1**	**MR2**	**MR3**	**MB1**	**MB2**	**MB3**
	0,079	0,081	0,081	0,068	0,080	0,079	0,081	0,082	0,082

Anexo 1 – Neste anexo estão representadas alguns dos cromatogramas obtidos na análise de HPLC.

1.1 – Na figura 29 está representado o cromatograma com os picos dos quatros padrões estudados, onde se pode verificar os seus tempos de retenção.

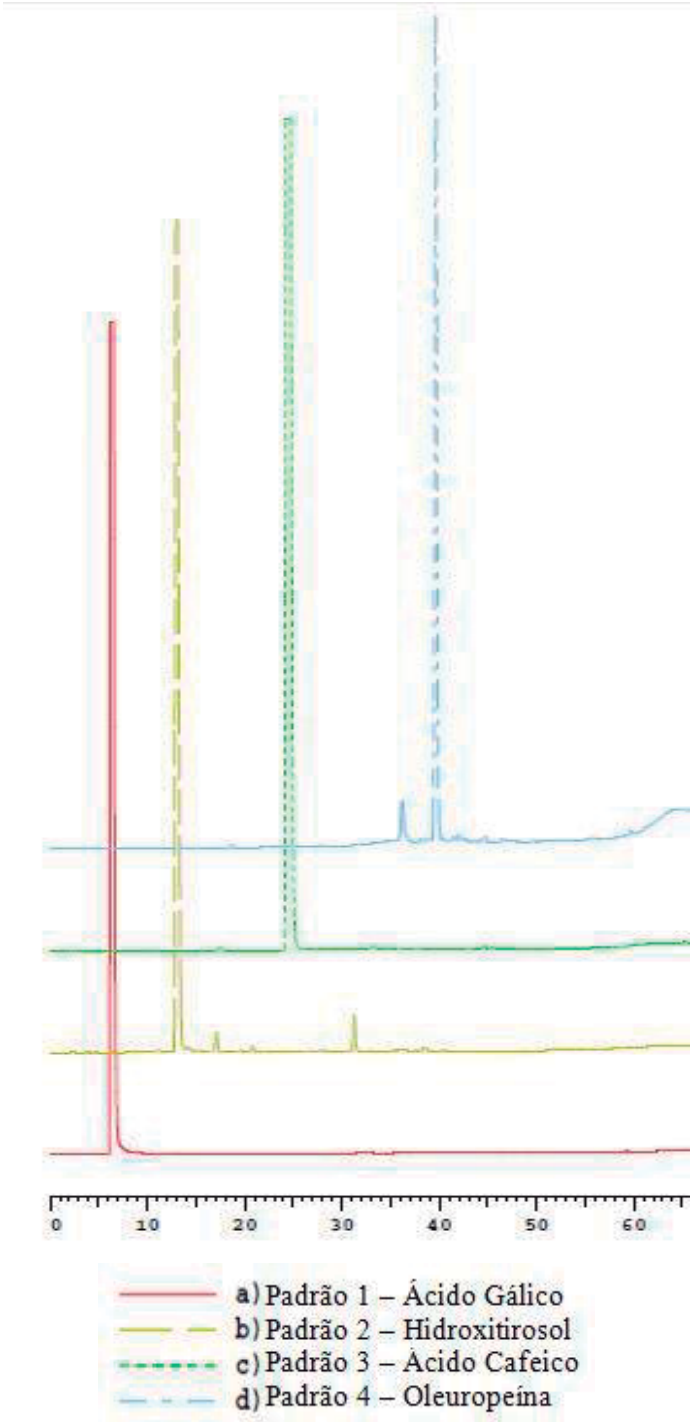


Figura 29 – Cromatograma obtido após leitura dos 4 padrões individualmente.
Nota – Eixo X: Tempo de retenção (min)

1.2 – Na figura 30 está o cromatograma de uma amostra com elevados níveis destes polifenóis da margem esquerda (amostra: VC3).

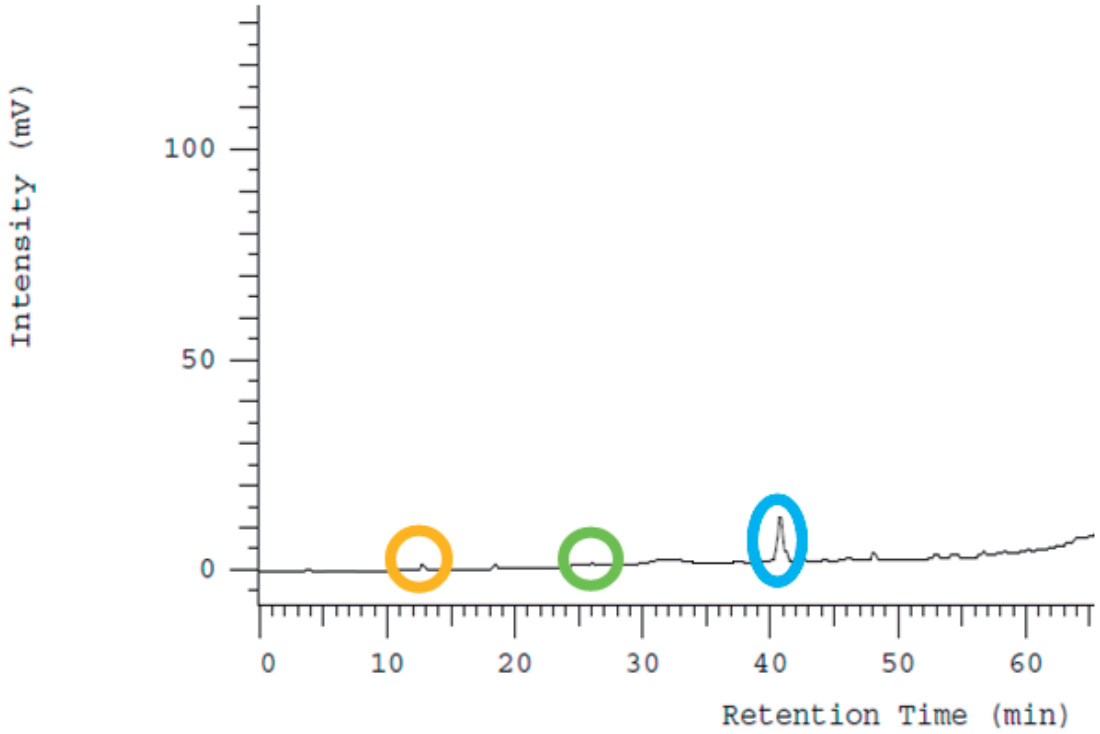


Figura 30 – Cromatograma exemplificativo de uma amostra da margem esquerda com níveis mais elevados dos polifenóis em estudo

1.3 – Na figura 31 está o cromatograma de uma amostra com baixos níveis destes polifenóis da margem direita (amostra: VB3).

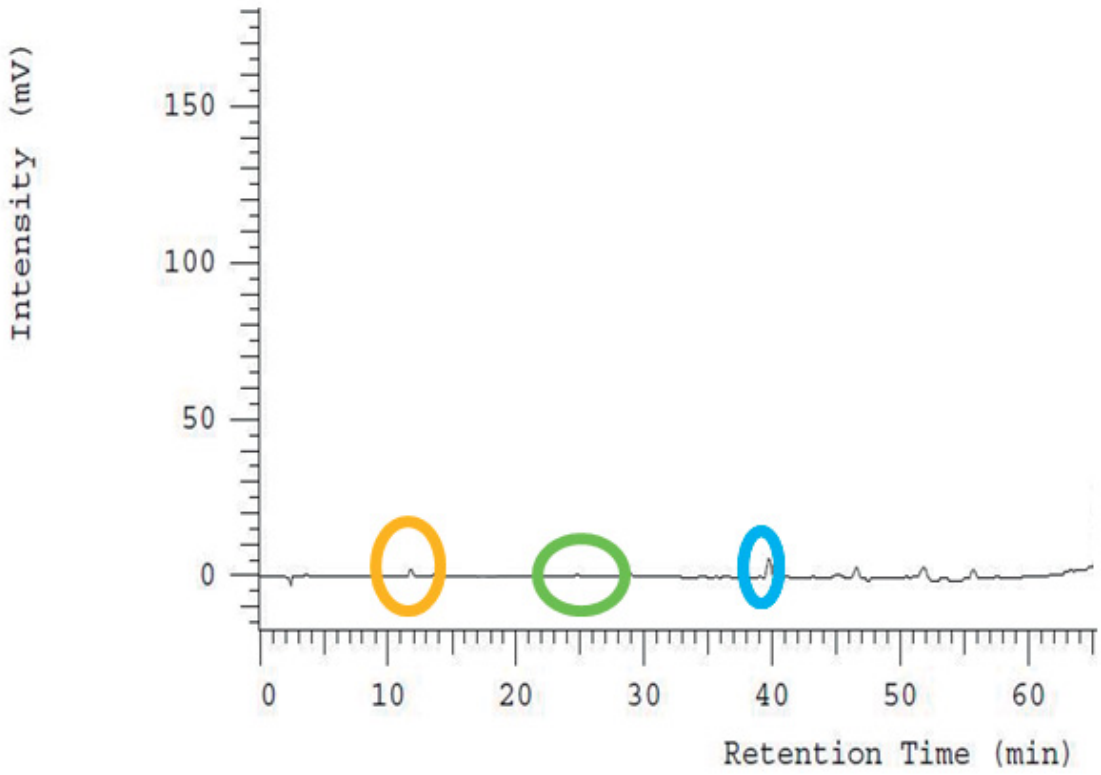


Figura 31 – Cromatograma exemplificativo de uma amostra da margem direita com níveis mais baixos dos polifenóis em estudo.

Anexo 2 – Neste anexo são apresentadas as cartas de solos das freguesias de onde foram recolhidas as amostras para estudo neste projeto, todas na escala de 1:50 000.

(Nota: alguns solos apresentam-se nas imagens como X+Y o que significa solos complexos consitutidos por solos X e solos Y)

2.1 – Nas figuras 32 a 34 estão representados os solos das amostras da Margem direita do Rio Guadiana.

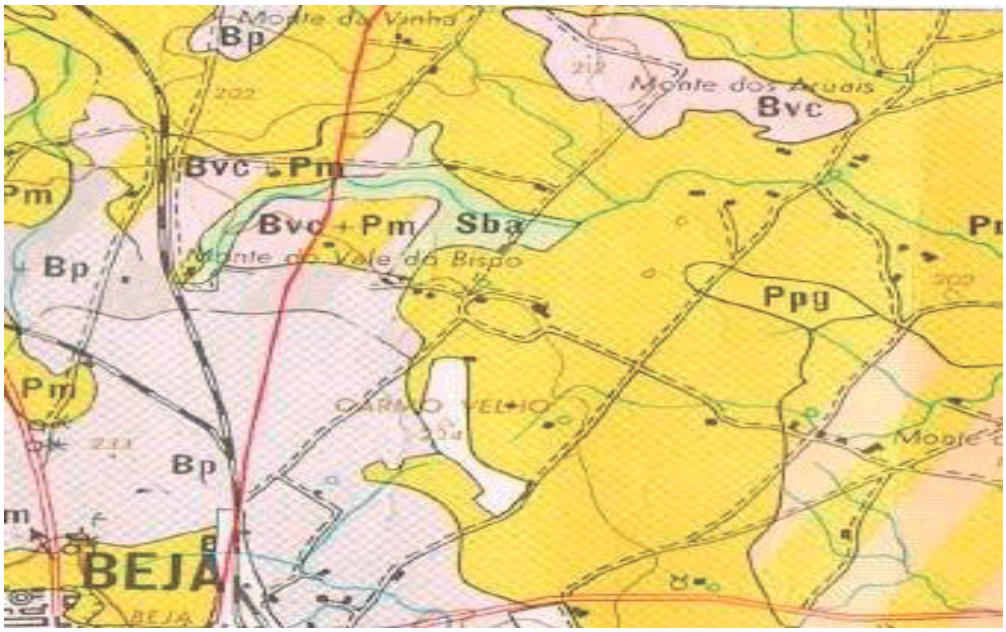


Figura 32 - Carta de solos da freguesia de Santa Maria do concelho de Beja, para as amostras VB e MB.
Fonte: SROA – Carta de Solos de Portugal nº 43C (1966)

Legenda:

Bp - solos pretos não calcários de dioritos ou gabros

Bvc - solos castanho-avermelhados calcários muito descarbonados de dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas.

Sba - solos de baixas de textura pesada

Pm - solos mediterrâneos pardos de dioritos ou rochas microfaneriticas ou cristalofílicas afins

Ppg - solos litolíticos não húmicos de rochas microfíricas claras

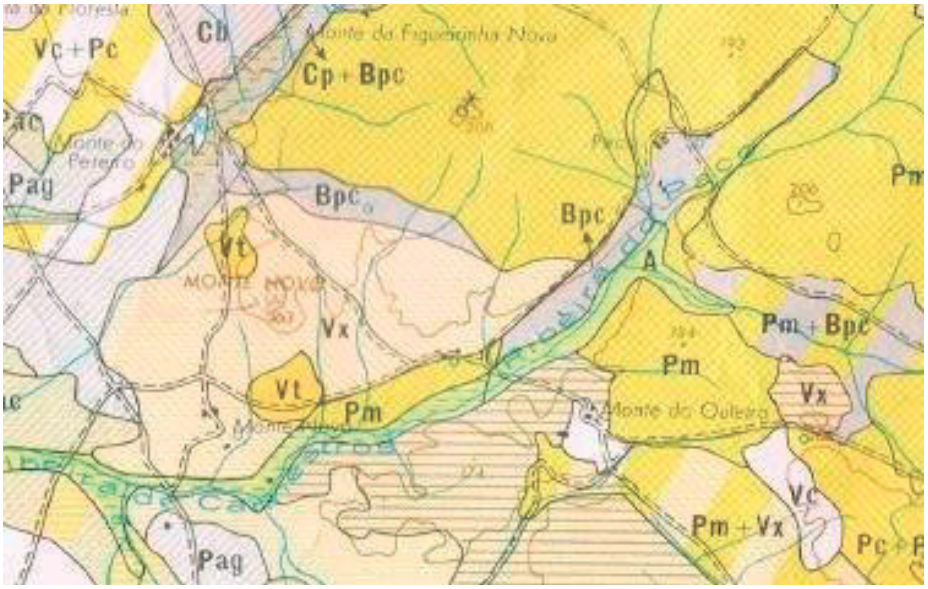


Figura 33 - Carta de solos da freguesia de São Brissos do concelho de Beja, para as amostras VF e MF.

Fonte: SROA – Carta de Solos de Portugal nº 43C (1966)

Legenda:

Vc - solos calcários vermelhos de calcários

Pc - solos calcários pardos de calcariios nao compactos

Cb - barros castanhos-avermelhados nao calcários de basaltos ou doleritos ou outras rochas eruptivas basicas

Pag - solos ligeiramente hidromórficos de arenitos ou conglomerados argilosos

Bpc - barros pretos calcários muito descarbonados, de dioritos ou gabros

Cp - solos calcários vermelhos de calcários

Vt - solos litólicos nao humicos de arenitos

Pm - solos mediterrâneos pardos de diuoritos ou rochas microfaneriticas ou cristalofilicas afins

Vx - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de xistos.

Vc - solos calcários vermelhos de calcários

Figura 34 - Carta de solos da freguesia de Reguengos de Monsaraz do concelho de Reguengos de Monsaraz, para as amostras VR e MR

Fonte: SROA – Carta de Solos de Portugal nº 40B (1966)

Legenda:

Pmg - solos mediterrâneos pardos de quartzodioriticos

Arg - afloramentos rochosos de granitos ou quartzodioritos

Pm - solos mediterrâneos pardos de diorito ou quartzodioritos ou rochas microfaneriticas ou cristalofílicas afins.

2.2 – Nas figuras 35 e 37 estão representados os solos das amostras da Margem esquerda do Rio Guadiana.

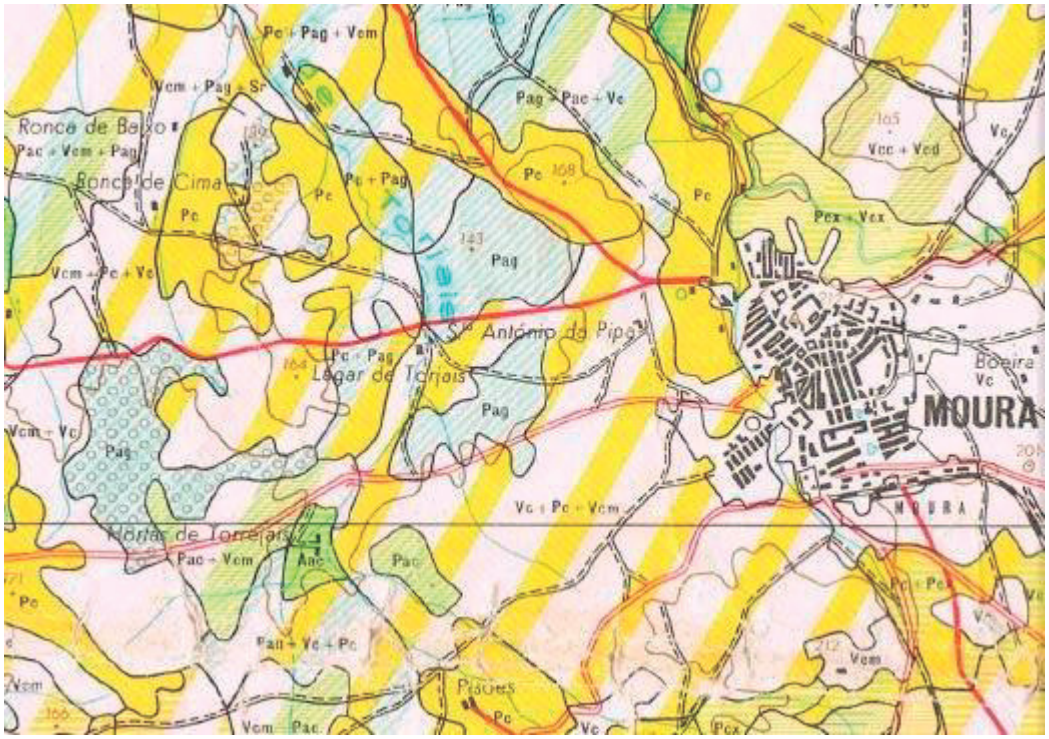


Figura 35 - Carta de solos da freguesia de S. João Batista do concelho de Moura, amostras VM, MM.

Fonte: SROA – Carta de Solos de Portugal nº 43B (1966)

Legenda:

Pc - solos calcários pardos de calcários nao compactos

Pag - solos mediterrâneos pardos para-solos hidromórficos de arenitos ou conglomerados argilosos

Vcm - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de margas ou calcários margosos

Sr - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de "rañas" ou depósitos afins

Pac - solos mediterrâneos pardos de margas ou calcários margosos

Vc - solos calcários vermelhos de calcários

Vcc - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de calcários cristalinos ou marmores ou rochas cristalofílicas calcio-siliciosas

Vcd - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de calcários compactos ou dolomias

Pcx - solos calcários pardos de xistos associados a depósitos calcários)

Vcx - solos calcários vermelhos de xistos associados a depósitos calcários)

Aac - aluviossolos modernos de textura pesada calcários.

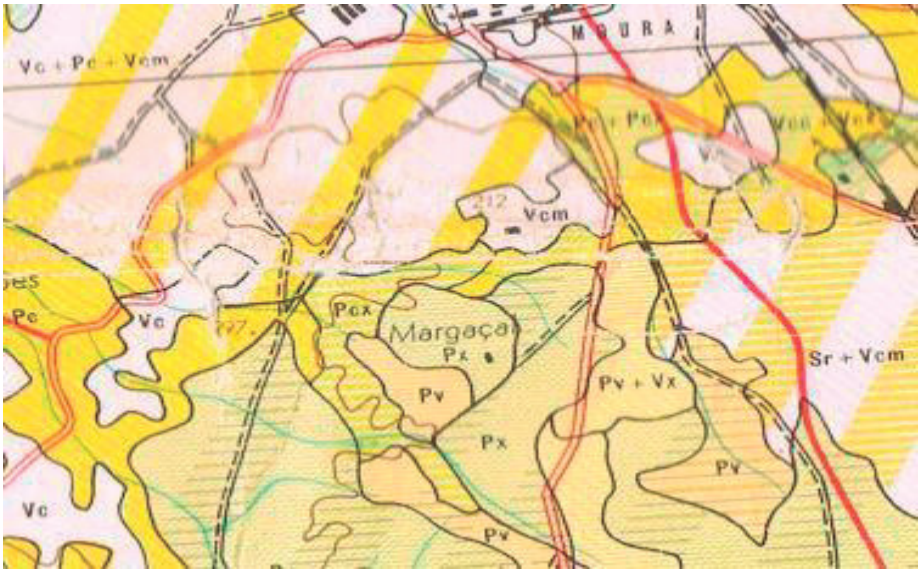


Figura 36 - Carta de solos da freguesia de Santo Agostinho do concelho de Moura, amostras VC, MC.

Fonte: SROA – Carta de Solos de Portugal nº 43B (1966)

Legenda:

Vc - solos calcários vermelhos de calcários

Pcx - solos calcários pardos de xistos associados a depósitos calcários)

Px - solos mediterrâneos pardos de xistos ou grauvaques

Pv - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de rochas cristalofílicas básicas

Pc - solos calcários pardos de calcários não compactos

Vx - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de xistos

Sr - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de "rañas" ou depósitos afins

Vcm - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de margas ou calcários margosos

Vcc - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de calcários cristalinos ou mármores ou rochas cristalofílicas cálcio-siliciosas

Vcx - solos calcários vermelhos de xistos associados a depósitos calcários)

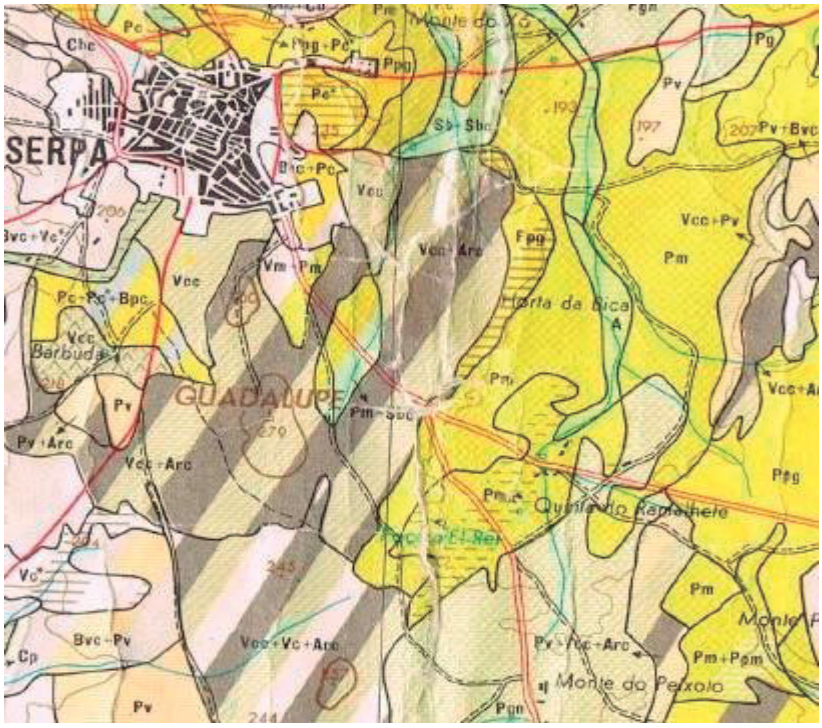


Figura 37 – Carta de solos da freguesia a Freguesia Salvador do concelho de Serpa, amostras VE, ME.
Fonte: SROA – Carta de Solos de Portugal nº 43D (1966)

Legenda:

Pc - solos calcários pardos de calcários nao compactos

Cbc - barros castanhos avermelhados calcários nao descarbonatados, de basaltos ou doleritos

Ppg - solos litolicos nao humicos de rochas microfiricas claras

Sb - solos de baixas (coluviossolos) de textura mediana

Sbc - solos de baixas (coluviossolos) de textura mediana calcários

Bvc – barros castanho-avermelhados calcários muito descarbonatados, de dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas

Pv - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de rochas cristalofílicas basicas

Pc* - solos calcários pardos de calcários nao compactos associados a dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas basicas

Vcc - solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de calcários cristalinos ou marmores ou rochas cristalofílicas calcio-siliciosas

Pv – solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de rochas cristalofílicas básicas

Arc –afloramentos rochosos de calcários ou dolomias

Pm - solos mediterrâneos pardos de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneriticas ou cristalofílicas afins

Vm – solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de dioritos ou quartzodioritos ou rochas microfaneriticas

Vc - solos calcários vermelhos de calcários

Ppm – solos mediterrâneos pardos para-solos hidromórficos de rochas microfiricas (pórfiros).

Anexo 3 – Neste anexo são apresentadas figuras correspondentes a factores edafoclimáticos que podem causar alterções nas oliveiras, azeitonas e azeites virgens destas formados.

3.1 – Nas figuras 38 e 39 estão representadas as altitudes mínimas e máximas, respectivamente, que tem cada concelho de onde foram recolhidas amostras para este projeto.

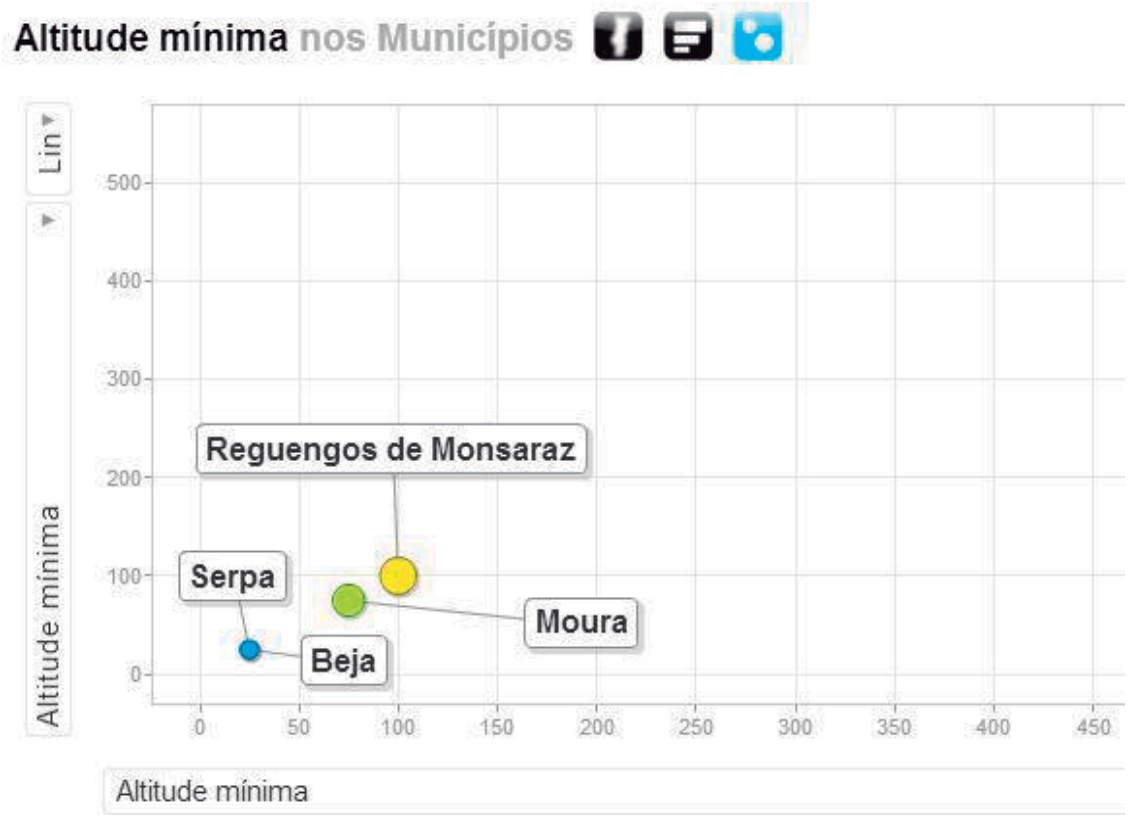


Figura 38 – Altitude mínima nos municípios de onde foram recolhidas as amostras.
Fonte: Pordata, 2013.

Legenda: Beja e Serpa são 25 m; Moura 75 m; Reguengos de Monsaraz 100 m.

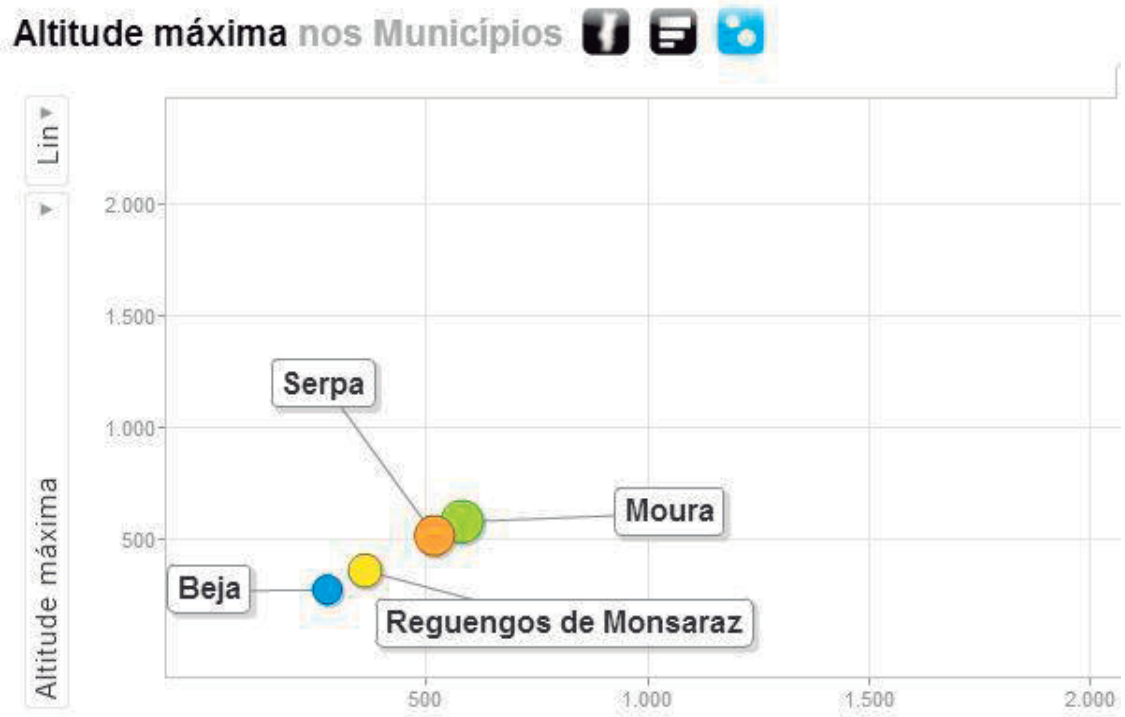


Figura 39 – Altitude máxima nos municípios de onde foram recolhidas as amostras.
Fonte: Pordata, 2013

Legenda: Beja 278 m; Reguengos de Monsaraz 363 m; Serpa 520 m; Moura 582 m.

3.2 – Na figura 40 está representada a precipitação total do ano 2012, registada na estação metereológica de Beja.

Precipitação total

mm

Anos	Estações m... Beja
2009	489,4
2010	816,5
2011	656,8
2012	572,4

Fonte de Dados: IPMA/MAMAOT
Fonte: PORDATA
Última actualização: 2013-02-15 12:50:40

Figura 40 – Precipitação total anual.
Fonte: Pordata, 2013

Uma vez que na figura anterior o valor total é referente à estação meteorológica de Beja e existem amostras de outros locais mais distantes, verificam-se nas figuras 41 a 45 os valores mensais de todo o país onde se verifica que todos os locais em estudo têm valores muito próximos de precipitação, daí que na conclusão se refira apenas ao valor total anual registado nesta estação meteorológica.

Mapas de precipitação de total de Janeiro a Setembro de 2012 de Portugal Continental (figuras 41 a 45; fonte: Pordata (2013))

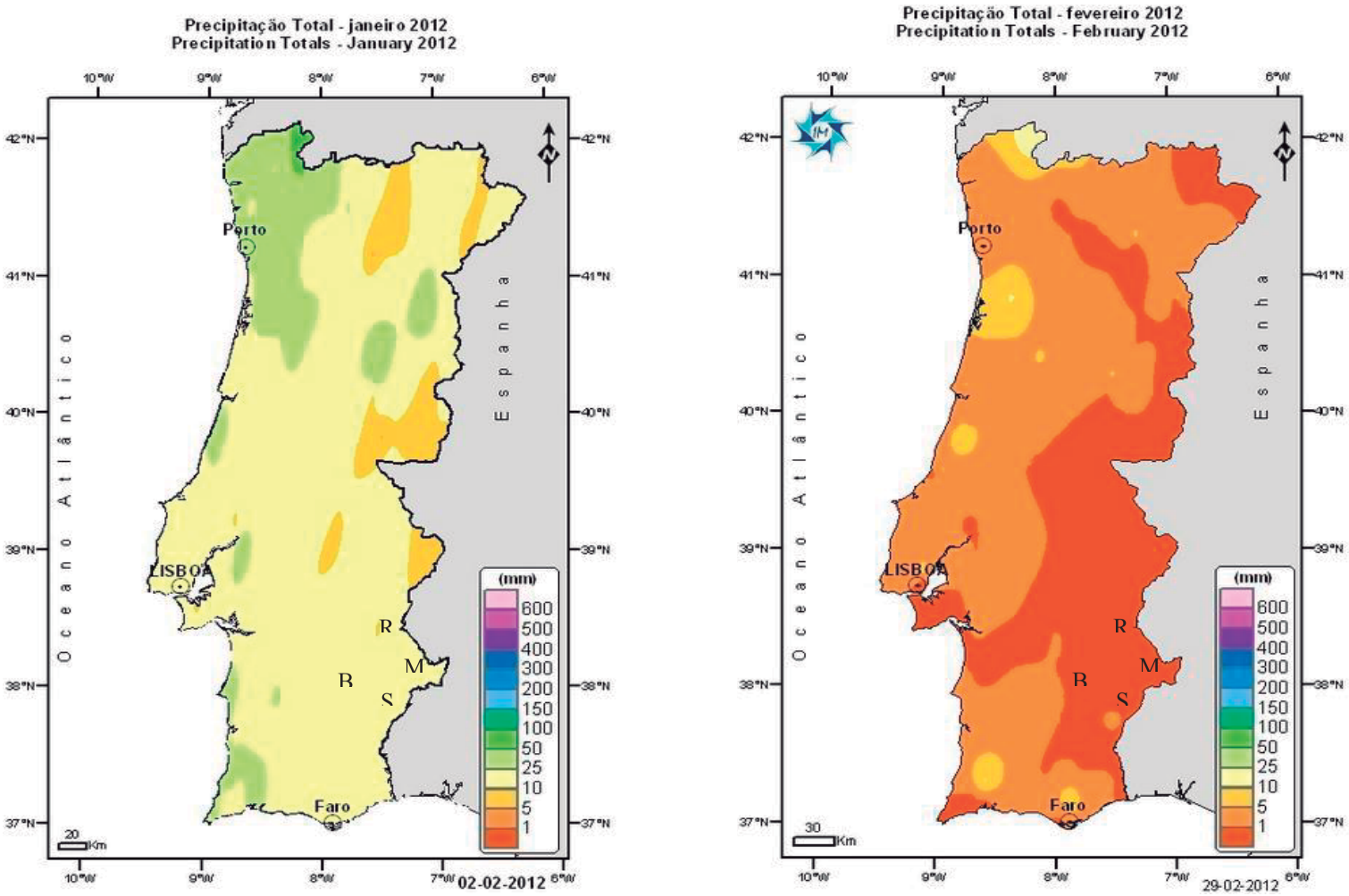


Figura 41 - Mapas de precipitação de Janeiro e Fevereiro de 2012

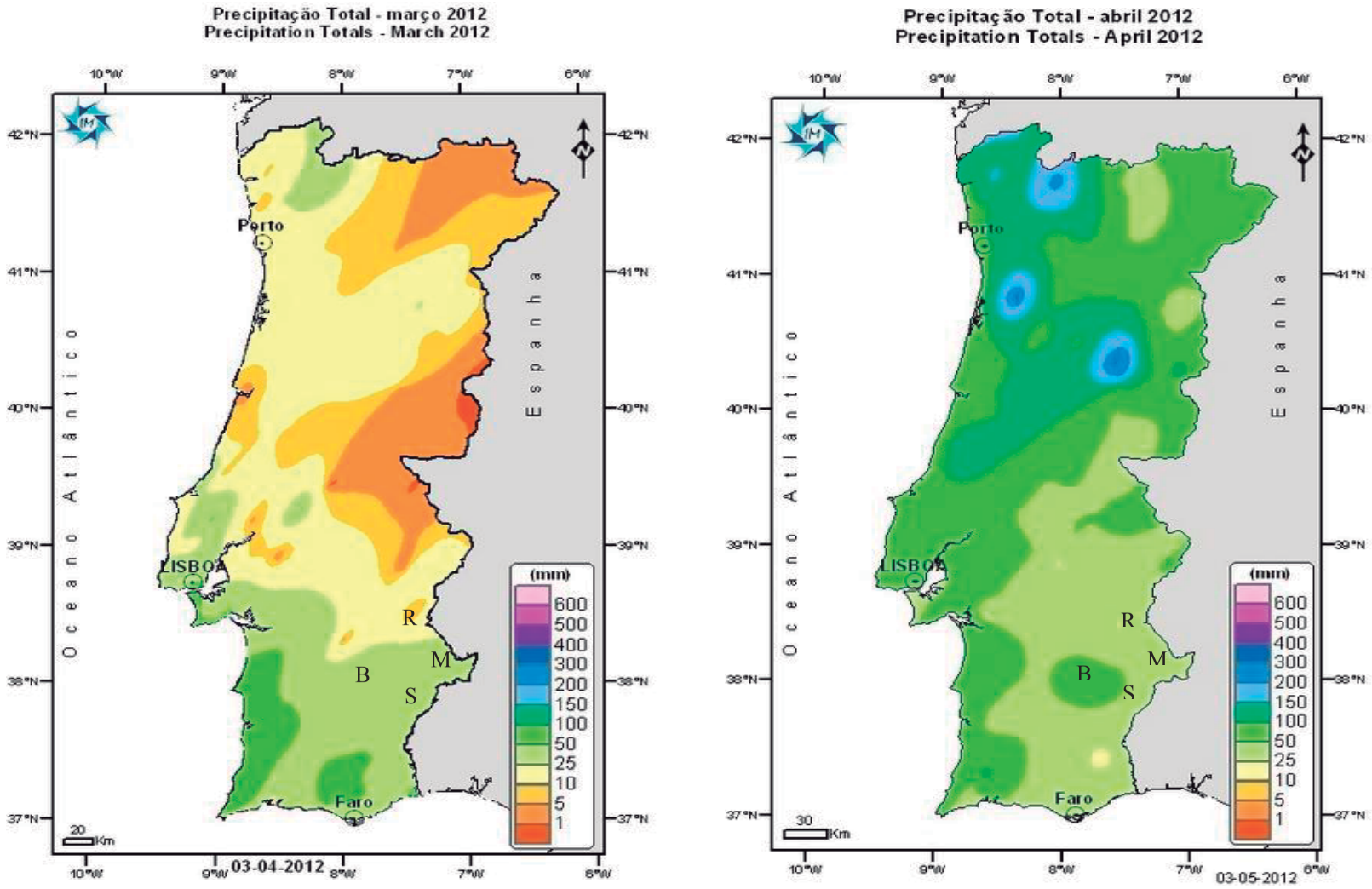


Figura 42 - Mapas de precipitação de Março e Abril de 2012

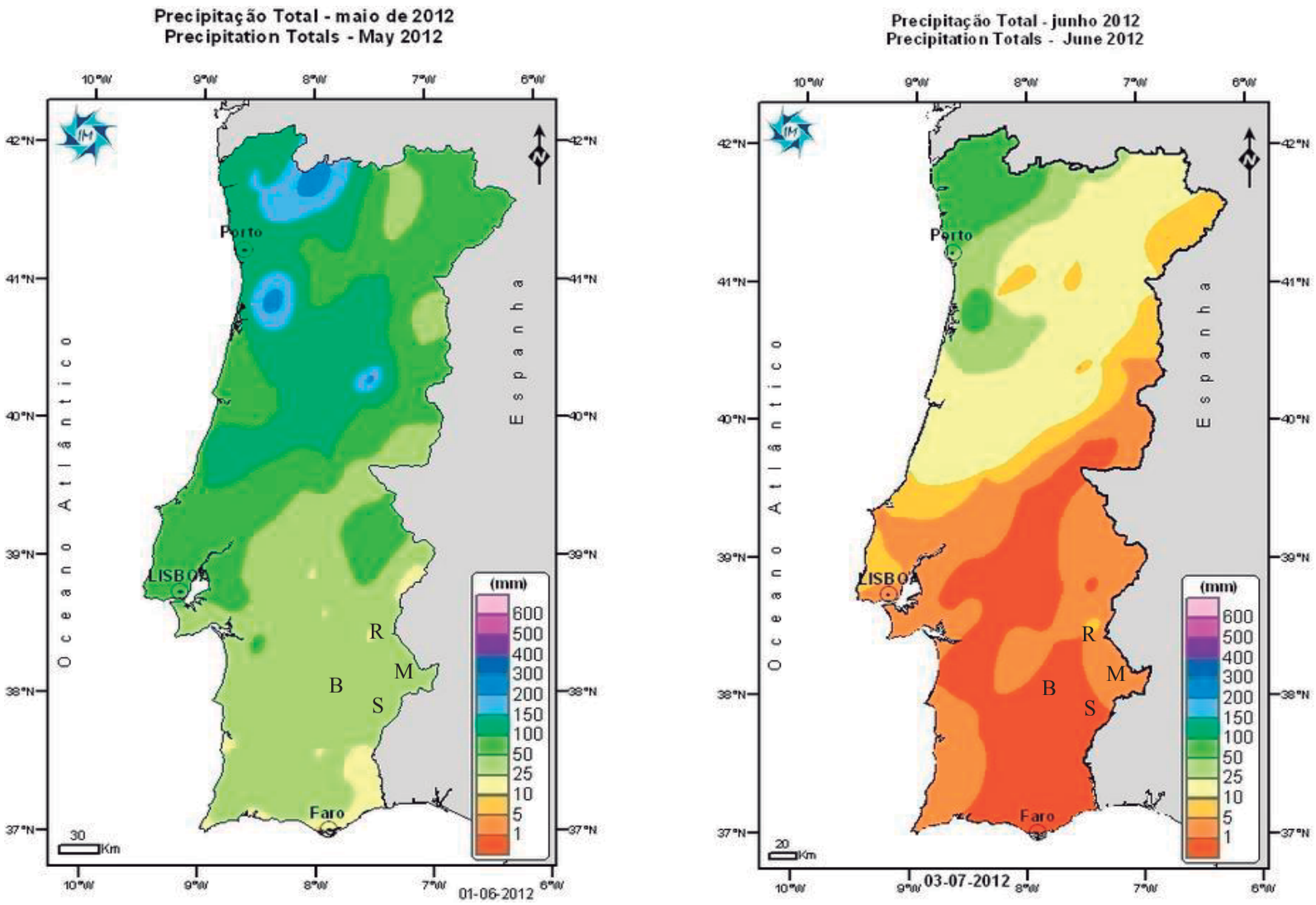


Figura 43 - Mapas de precipitação de Maio e Junho de 2012

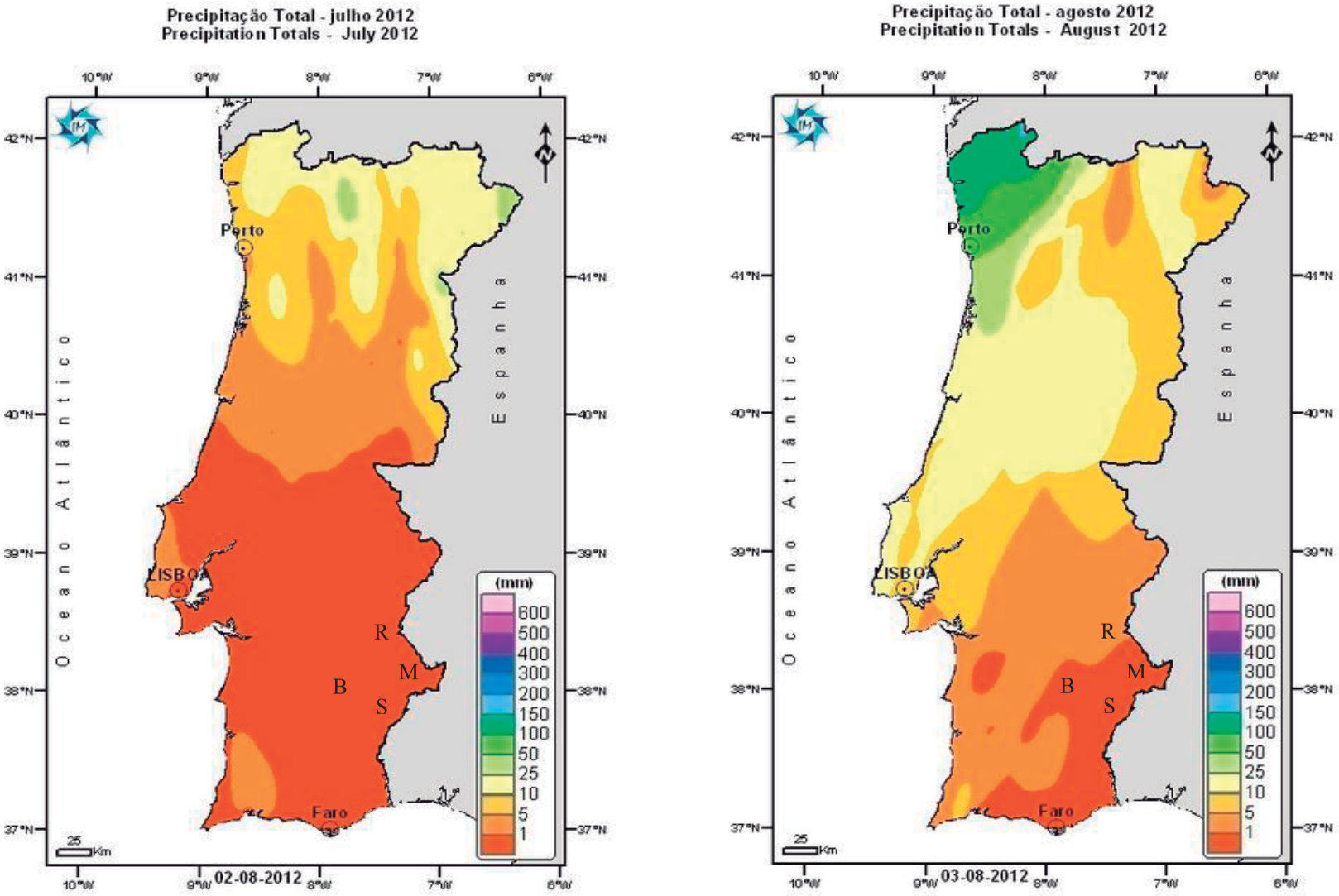
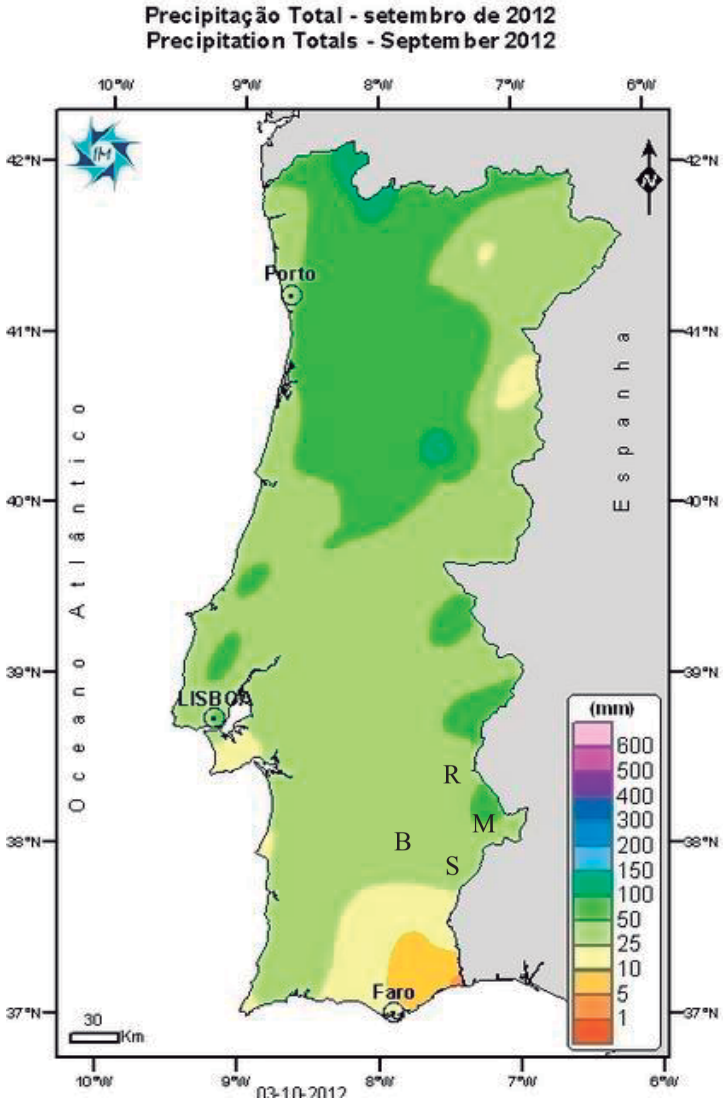


Figura 44 - Mapas de precipitação de Maio e Junho de 2012



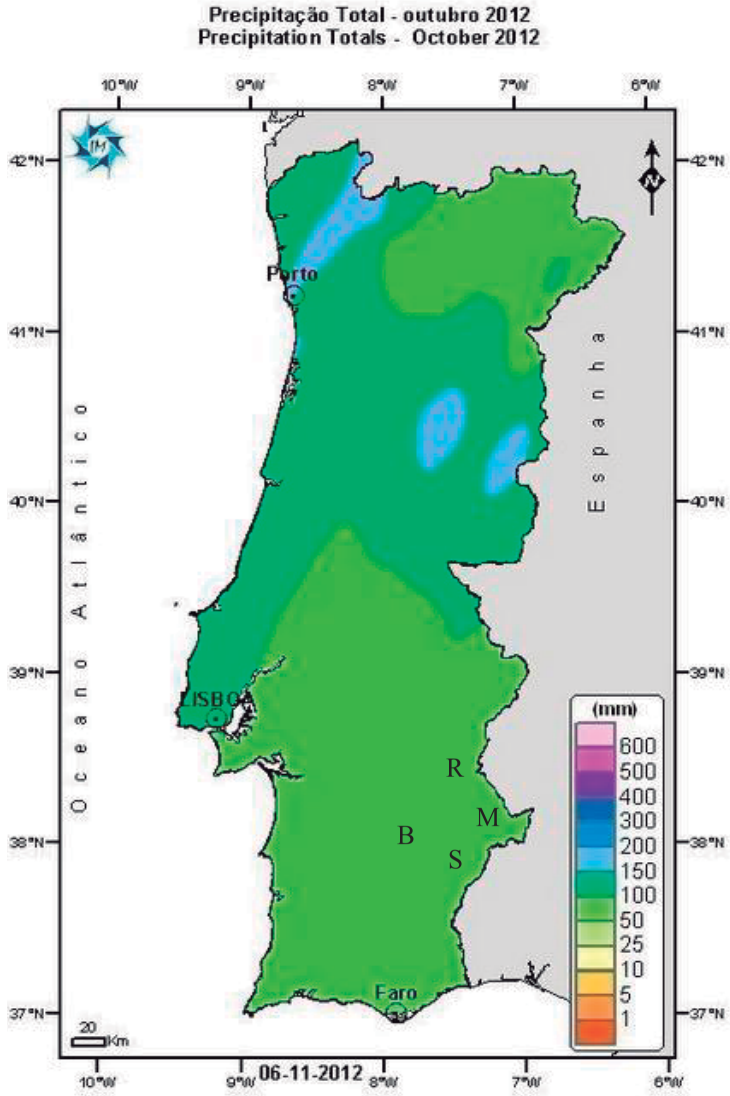


Figura 45 - Mapas de precipitação de Julho e Agosto de 2012

3.3 – Na figura 46 está representada a temperatura média do ano 2012, registada na estação metereológica de Beja.

°C - Média

Anos	Estações meteorológicas								
	Viana do Castelo	Bragança	Porto	Castelo Branco	Lisboa	Beja	Faro	Funchal	Angra do Heroísmo
+ 1960	x	11,7	x	15,2	16,8	15,9	x	18,7	x
+ 1970	14,3	12,0	13,8	15,7	16,7	16,0	17,1	18,3	16,6
+ 1980	14,6	12,1	14,1	15,9	16,9	16,5	17,5	19,0	17,2
+ 1990	15,6	13,2	15,2	16,0	17,5	17,1	17,7	19,5	16,8
2000	15,0	12,5	14,8	15,6	17,5	17,0	18,0	19,5	17,4
2001	15,2	12,5	14,9	15,6	17,2	17,0	18,1	20,5	17,5
2002	15,4	12,8	15,0	15,8	17,4	16,9	18,1	20,2	17,1
2003	15,4	13,2	15,4	16,1	17,7	17,2	18,3	20,4	17,2
2004	15,1	12,6	14,9	16,0	17,5	17,1	18,1	20,5	17,8
2005	15,4	12,7	15,2	16,1	17,5	17,1	17,8	19,8	17,5
2006	15,1	13,3	15,9	16,5	18,0	17,4	18,4	20,3	17,4
2007	14,6	12,3	15,2	15,6	17,3	16,7	18,0	20,2	17,7
2008	14,3	12,4	15,0	15,5	17,3	16,5	17,8	20,3	18,0
2009	14,5	13,8	15,2	16,6	18,1	17,6	18,4	20,2	17,2
2010	14,5	12,5	15,4	16,0	17,7	17,1	18,6	20,2	17,0
2011	15,1	13,3	15,9	16,7	18,2	17,5	18,9	20,0	17,3
2012	14,1	12,6	14,9	15,9	17,5	16,7	18,2	20,4	17,9

Fontes/Entidades: IPMA/MAMAOT, PORDATA
Última actualização: 2013-02-15

Figura 46 – Temperatura média anual do ar.
Fonte: Pordata, 2013.

Também na figura 46 o valor total só referente a estação meteorológica de Beja, verifica-se nas figuras 47 a 49 que os valores mensais de todos os locais em estudo têm valores muito próximos de temperatura, daí que na conclusão se refira apenas ao valor total anual registado nesta estação meteorológica.

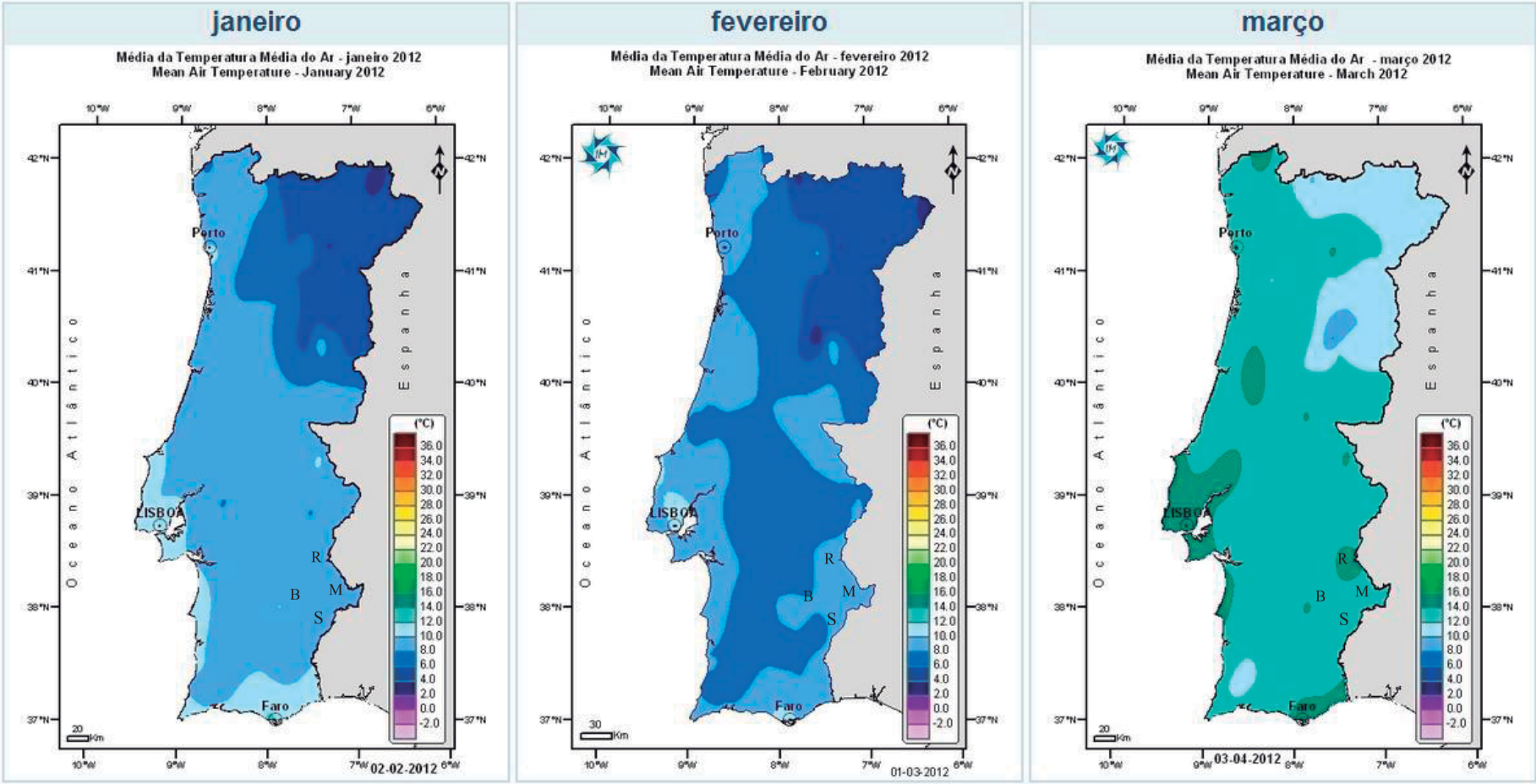


Figura 47 – Mapas de temperatura média do ar nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2012
Fonte: Pordata, 2013.

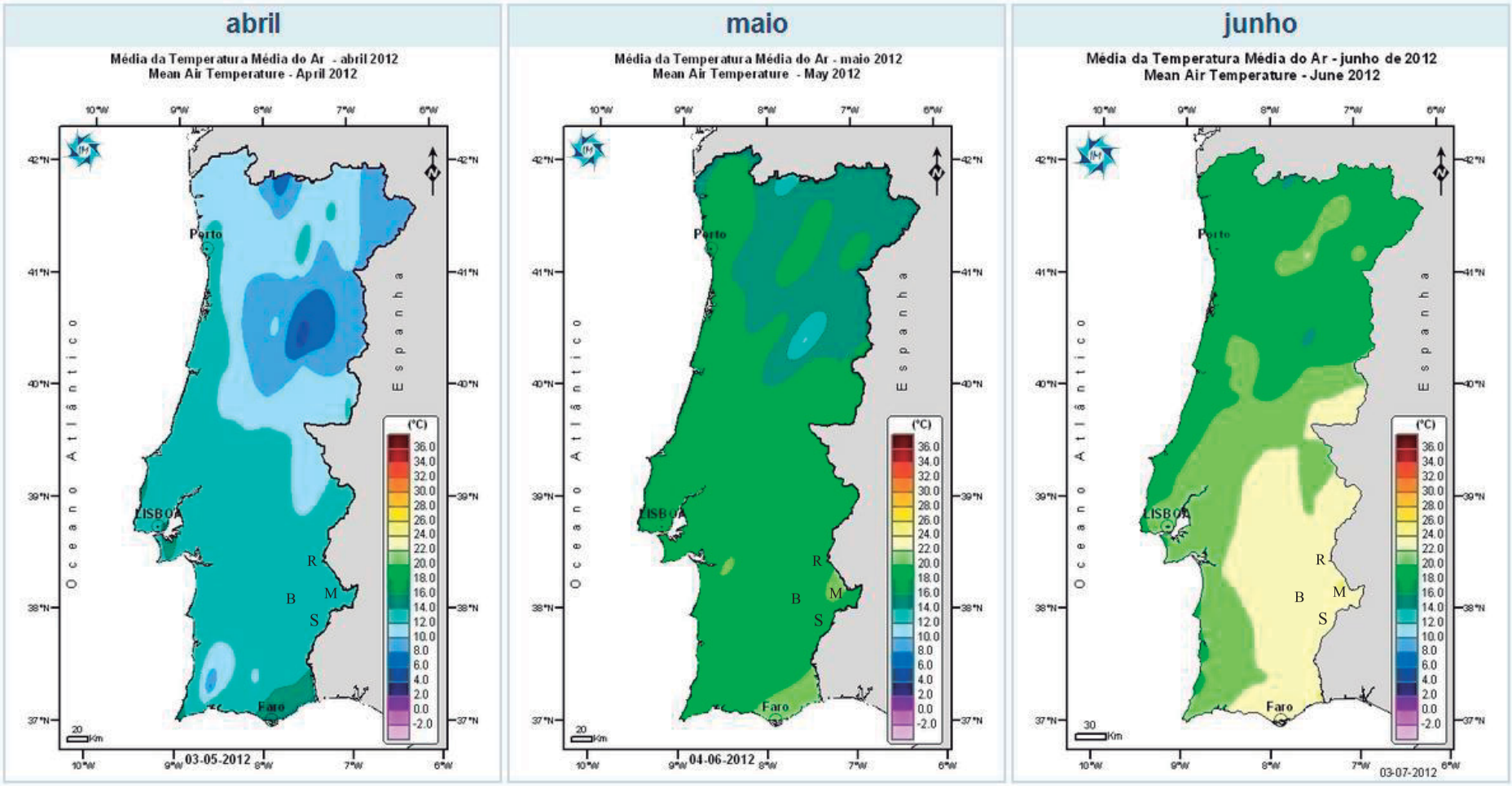


Figura 48 - Mapas de temperatura média do ar nos meses de Abril, Maio e Junho de 2012
Fonte: Pordata, 2013.

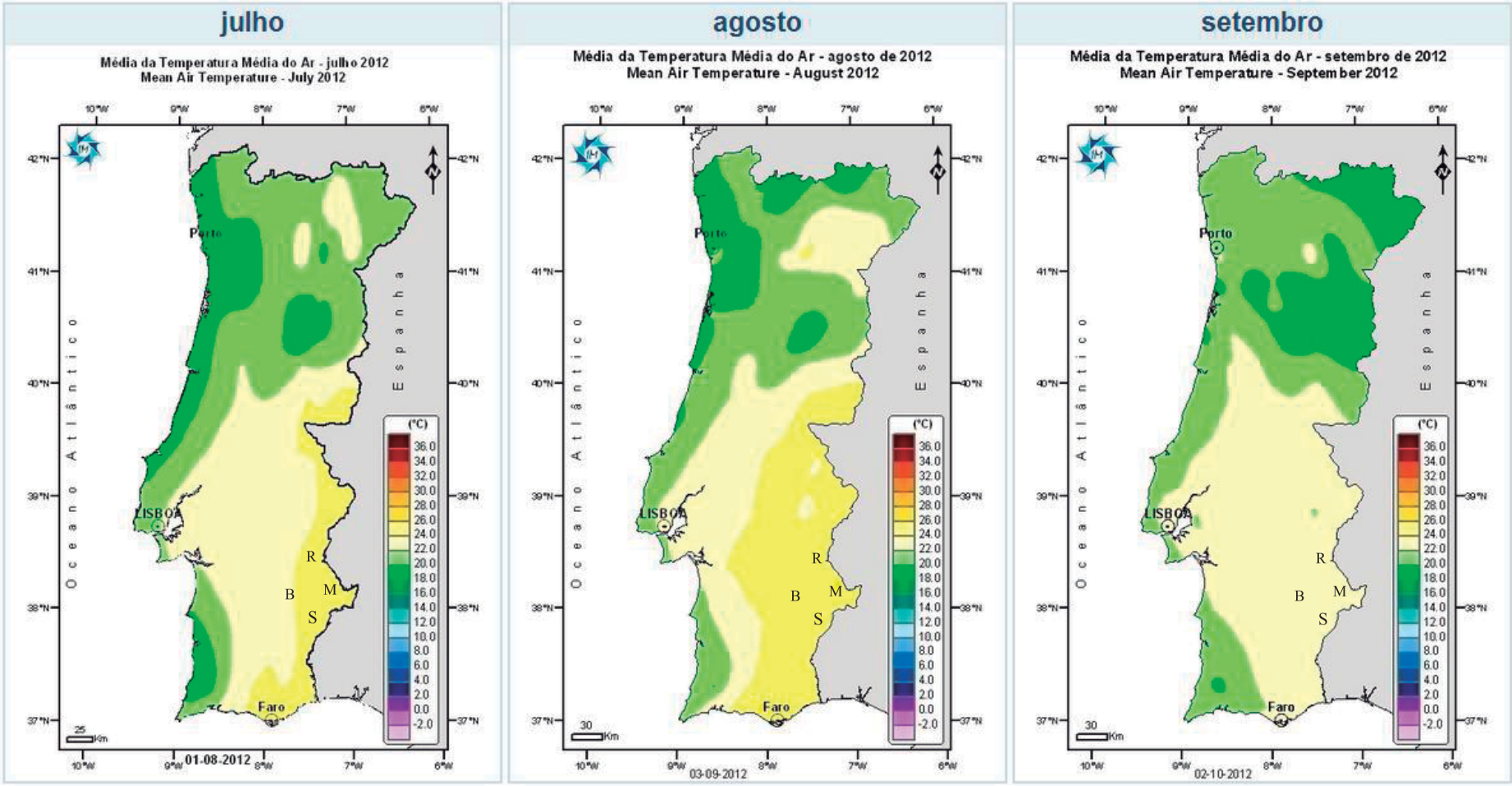


Figura 49 – Mapas de temperatura média do ar nos meses de Julho, Agosto e Setembro de 2012
Fonte: Pordata, 2013